

JAVIER ROCHA MARTÍN



**REDUCCIONES ASIMÉTRICAS Y OXIDACIONES
SELECTIVAS CATALIZADAS POR DESHIDROGENASAS
INMOVILIZADAS Y ESTABILIZADAS.**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid**

DIRECTORES:

JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJAS

FERNANDO LÓPEZ GALLEGO

**Instituto de Catálisis y Petroleoquímica,
C.S.I.C., Madrid**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Madrid, 2012**

A mis padres

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera expresar mis más profundos y sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible que la realización de esta Tesis Doctoral sea una realidad:

A José Manuel Guisán, co-director de esta Tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación durante todos estos años. Por todo su apoyo y entusiasmo, por compartir todos sus conocimientos científicos y su filosofía de la vida, por su visión siempre positiva ante cualquier resultado bueno o malo, por tantas horas de dedicación. Sin su incalculable ayuda esta Tesis no hubiera sido posible.

A Fernando López Gallego, co-director de esta Tesis, por toda su ayuda, enseñanzas y horas de dedicación en estos últimos años que han supuesto un impulso final, imprescindible y definitivo, para terminar de dar forma a este trabajo.

A José Berenguer, tutor de la presente Tesis Doctoral, por toda su ayuda, disponibilidad y colaboración en la búsqueda de nuevas deshidrogenasas en *Thermus*, sin las cuales no hubiera podido desarrollarse esta Tesis.

Al profesor Joaquín Pérez Pariente, director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, por todas las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, así como al personal del centro (Mantenimiento, Almacén, Secretaría, Unidad de Apoyo, etc.) por su soporte en el día a día.

A la Comunidad de Madrid, con cuyo Contrato de Personal Investigador de Apoyo, ha sido posible realizar este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio y amigos: Juanma y César Godoy por todos los buenos momentos vividos y su ayuda, sin olvidar todos esos viernes musicales a última hora de la tarde. A Mari Carmen, José Miguel, Oscar, Pilar, Zaida, Marco, Marzia, Gloria, Beni, Rocío, Sonia, Miguel, Cristina. Gracias a todos por vuestro cariño y por hacer que el día a día haya sido tan grato. A todos los compañeros y amigos que han pasado por el laboratorio en todo este tiempo y que he tenido el gusto de conocer: a todos los brasileños (Rafa, Gica, Loli, Caio, William, Andrea, Américo, etc.), chilenos (Pedro, a todas las “Lorenas”, etc.) y de otras nacionalidades (Veria, Andreina y un largo etcétera).

A César Mateo por guiarme en las primeras semanas de trabajo en el laboratorio, por compartir conmigo todos sus conocimientos científicos, como yo he compartido con él mis conocimientos tecnológicos...

A Roberto Fernández por ayudarme en mis primeros días de papeleos para poder conseguir una preciada beca. Por compartir tantas tertulias deportivas y científicas.

A Rosario Muñoz y Blanca de las Rivas por dejarme hacer mis pinitos en el mundo de la Biología Molecular. A mis compañeros y amigos del antiguo IFI: María, Natalia, Pura, Gerardo, Pepe, etc.

A M^a Isabel Gegúndez y Lourdes Lledó por darme la oportunidad de iniciarme en el maravilloso e impredecible mundo de la investigación. A Juan y Jesús por los buenos momentos vividos en los trampeos y en los viajesitos en el Ibiza blanco de Maribel.

A todos mis amigos, sí a vosotros.

A toda mi familia, por su total confianza, cariño y apoyo.

A Vero por sufrirme todos estos años....

Hasta esta noche, pensabas que la vida era absurda.

En lo sucesivo sabrás que es misteriosa.

Eric-Emmanuel Schmitt, *El visitante*.



Índice

ABSTRACT.

ABREVIATURAS.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1. 1 Química sostenible y biocatálisis.	1
1. 2. Quiralidad y su importancia.	3
1. 3. Biocatálisis en la industria. Características de las enzimas como catalizadores biológicos e industriales.	5
1. 4. Enzimas de microorganismos termófilos.	7
1. 5. Oxidorreductasas: deshidrogenasas.	8
1. 5. 1. Generalidades.	8
1. 5. 2. Aplicaciones de las deshidrogenasas.	10
1. 6. Cofactores de nicotinamida y flavina: NAD(P)H, FAD Y FMN.	12
1. 6. 1. Estabilidad de los cofactores redox.	13
1. 7. Regeneración del cofactor redox.	14
1. 7. 1. Ventajas.	14
1. 7. 2. Requerimientos del sistema de regeneración. Tipos de regeneración.	15
1. 7. 3. Regeneración enzimática del cofactor.	16
1. 7. 3. 1. Generalidades.	16
1. 7. 3. 2. NADH oxidasas como regeneradoras de NAD(P) ⁺ .	16
1. 8. Purificación de enzimas de microorganismos termófilos y mesófilos.	17
1. 8. 1. Purificación de proteínas termoestables mediante tratamiento térmico.	18
1. 8. 2. Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.	18
1. 9. Inmovilización de enzimas.	19
1. 9. 1. Métodos irreversibles: Inmovilización mediante enlace covalente.	21
1. 9. 1. 1. Unión covalente sobre soportes activados con grupos bromuro de cianógeno.	21
1. 9. 1. 2. Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos glioxil.	21
1. 9. 1. 3. Inmovilización sobre soportes heterofuncionales.	23
1. 9. 2. Métodos reversibles: Inmovilización por intercambio iónico.	24
1. 10. Estabilización de enzimas multiméricas.	25
1. 11. Reactivación de biocatalizadores.	27
1. 12. Sistemas multienzimáticos. Co-inmovilización de enzimas.	28
2. OBJETIVOS.	31
3. MATERIALES.	33
4. MÉTODOS.	35

4. 1. Preparación de soluciones enzimáticas.	35
4. 1. 1. Clonaje y expresión en <i>E. coli</i> de una glicerol deshidrogenasa de <i>Citrobacter braakii</i> (Cb-GyDH).	35
4. 1. 1. 1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.	35
4. 1. 1. 2. Clonación y expresión del gen <i>dhaD</i> .	35
4. 1. 1. 3. Producción de la enzima recombinante Cb-GyDH en <i>E. coli</i> .	36
4. 1. 1. 4. Purificación de la enzima Cb-GyDH.	36
4. 1. 2. Producción y purificación de la ADH1 recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB 27 (Tt27-ADH1).	36
4. 1. 3. Producción y purificación de la ADH2 recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB 27 (Tt27-ADH2).	37
4. 1. 4. Producción y purificación de la NADH oxidasa de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 (Tt27-NOX).	37
4. 1. 5. Producción y purificación de glutamato deshidrogenasa recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB 27 (Tt27-GDH).	38
4. 1. 6. Preparación de la solución enzimática de glicerol deshidrogenasa de <i>Gluconobacter oxydans</i> (Gox-GyDH).	39
4. 1. 7. Preparación de la solución enzimática de formiato deshidrogenasa de <i>Pseudomonas</i> sp. (Ps-FDH).	39
4. 2. Determinación de la actividad enzimática.	39
4. 2. 1. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-ADH1.	40
4. 2. 2. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-ADH2.	40
4. 2. 3. Determinación de la actividad enzimática de la Cb-GyDH.	41
4. 2. 4. Determinación de la actividad enzimática de la Gox-GyDH.	41
4. 2. 5. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-NOX.	41
4. 2. 6. Determinación de la actividad enzimática de la Ps-FDH.	42
4. 2. 7. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-GDH.	42
4. 3. Preparación de soportes sobre agarosa BCL.	42
4. 3. 1. Preparación de agarosa glioxil (Ag-Glx).	42
4. 3. 2. Preparación de agarosa mono-aminoetil-N-etil (Ag-MANAE).	43
4. 3. 3. Preparación de agarosa polietilenimina (Ag-PEI).	43
4. 3. 4. Preparación de agarosa dextrano-sulfato (Ag-DS).	43
4. 3. 5. Preparación de agarosa epóxido.	44
4. 3. 6. Preparación de soportes cromatográficos de afinidad (soportes IMAC).	44
4. 3. 7. Preparación de los soportes heterofuncionales.	45
4. 3. 7. 1. Activación de agarosa con grupos epóxidos.	45
4. 3. 7. 2. Modificación del soporte agarosa epóxido con diferentes grupos reactivos.	45
4. 3. 7. 3. Preparación de soportes heterofuncionales agarosa glioxil disulfuro (Ag-S-Glx).	46
4. 4. Inmovilización de enzimas.	47
4. 4. 1. Generalidades.	47

4. 4. 2. Inmovilización sobre soportes por adsorción física mediante intercambio iónico.	48
4. 4. 2. 1. Inmovilización sobre intercambiadores aniónicos: agarosa dietilaminoetil (DEAE Sepharose®), agarosa monoamino-N-aminoetil (Ag-MANAE), agarosa polietilenimina (Ag-PEI) y Q- Sepharose®.	48
4. 4. 2. 2. Inmovilización sobre intercambiadores catiónicos: inmovilización en agarosa dextrano sulfato (Ag-DS), Carboximetil Sepharose® y Sulfopropil Sepharose®.	48
4. 4. 3. Inmovilización en soportes cromatográficos de afinidad Cu ²⁺ o Ni ²⁺ (Ag-IDA-Cu ²⁺ o Ni ²⁺).	48
4. 4. 4. Inmovilización mediante unión covalente.	48
4. 4. 4. 1. Inmovilización en soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (BrCN Sepharose®).	48
4. 4. 4. 2. Inmovilización en soportes activados con grupos glioxil (Ag-Glx).	49
4. 4. 4. 3. Inmovilización en soportes agarosa heterofuncionales.	50
4. 5. Modificación química de enzimas. entrecruzamiento con dextrano-aldehído.	51
4. 5. 1. Preparación de dextrano-aldehído.	51
4. 5. 2. Entrecruzamiento de enzimas inmovilizadas con dextrano-aldehído.	51
4. 6. Efecto de temperatura y pH en la actividad de la enzima soluble y la enzima inmovilizada.	52
4. 7. Efecto del FAD y FMN exógeno en la actividad de la Tt27-NOX soluble e inmovilizada.	52
4. 8. Efecto de la incubación de la Tt27-NOX a altas temperaturas.	52
4. 9. Determinación de la formación de H₂O₂ por Tt27-nox.	53
4. 10. Determinación de la concentración de proteína.	53
4. 10. 1. Medida mediante el método de Bradford.	53
4. 10. 2. Medida mediante el método BCA.	54
4. 11. Determinación de parámetros cinéticos.	54
4. 12. Estudio de la inhibición no competitiva.	54
4. 13. Estudio de la estabilidad de preparaciones enzimáticas.	55
4. 13. 1. Inactivaciones térmicas de diferentes preparaciones.	55
4. 13. 2. Inactivaciones y actividad catalítica en presencia de disolventes orgánicos.	55
4. 13. 3. Estabilidad en presencia de agentes caotrópicos.	56
4. 14. Reactivación enzimática.	56
4. 15. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	56
4. 16. Estudios de localización espacial de biocatalizadores inmovilizados.	57
4. 16. 1. Marcaje de proteínas con sondas fluorescentes.	57
4. 16. 2. Microscopía laser confocal de barrido de proteínas marcadas con fluorescencia e inmovilizadas.	57
4. 16. 3. Localización espacial de los biocatalizadores inmovilizados.	57

4. 17. Reacciones redox.	58
4. 17. 1. Resolución cinética de (<i>rac</i>)-1-feniletanol por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.	58
4. 17. 2. Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH o Tt27-ADH2/Tt27-GDH.	59
4. 17. 3. Resolución cinética dinámica del (<i>rac</i>)-2-fenilpropanal por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH y Gox-GyDH/Ps-FDH.	60
4. 17. 4. Oxidación selectiva de glicerol a dihidroxiacetona por el sistema bi-enzimático Cb-GyDH/Tt27-NOX.	61
4. 18. Métodos bioinformáticos.	61
4. 18. 1. Estudios de dinámica molecular.	61
4. 18. 2. Estudios de docking.	61
5. RESULTADOS.	63
5. 1. Purificación, caracterización, inmovilización estabilización y reactivación de una alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 (Tt27-ADH2).	63
5. 1. 1. Clonaje y expresión en <i>E. coli</i> de la enzima Tt27-ADH2.	63
5. 1. 2. Purificación de la Tt27-ADH2.	64
5. 1. 3. Caracterización bioquímica de la Tt27-ADH2.	66
5. 1. 3. 1. Especificidad de sustrato.	66
5. 1. 3. 2. Parámetros cinéticos.	67
5. 1. 3. 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la Tt27-ADH2 soluble.	68
5. 1. 3. 4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-ADH2 soluble.	68
5. 1. 4. Inmovilización y estabilización de la Tt27-ADH2.	69
5. 1. 4. 1. Inmovilización de la Tt27-ADH2 mediante diferentes estrategias.	69
5. 1. 4. 2. Estabilidad térmica de la Tt27-ADH2 inmovilizada.	70
5. 1. 4. 3. Optimización de la inmovilización de Tt27-ADH2 en Ag-Glx.	71
5. 1. 4. 4. Actividad y estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados de Tt27-ADH2 en presencia de disolventes orgánicos.	72
5. 1. 5. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada.	73
5. 1. 5. 1. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada inactivada a altas concentraciones de agentes caotrópicos. Optimización de la reactivación.	73
5. 1. 5. 2. Reactivación de derivados inmovilizados de Tt27-ADH2 inactivados en altas concentraciones de disolventes.	74
5. 2. Purificación, inmovilización-estabilización de una glicerol deshidrogenasa recombinante de <i>Citrobacter braakii</i> (Cb-GyDH).	75
5. 2. 1. Clonaje, expresión en <i>E. coli</i> y purificación de la Cb-GyDH.	75
5. 2. 2. Estudio de la inhibición no competitiva.	76
5. 2. 3. Inmovilización de la Cb-GyDH mediante diferentes estrategias.	76
5. 2. 3. 1. Inmovilización sobre BrCN Sepharose®.	77
5. 2. 3. 2. Inmovilización sobre agarosa glioxil a pH 10.	77
5. 2. 3. 3. Inmovilización sobre soportes heterofuncionales.	78

5. 2. 3. 4. Estabilidad térmica de la Cb-GyDH inmovilizada.	80
5. 2. 3. 5. Efecto de la inmovilización en la inhibición no competitiva.	80
5. 3. Purificación, caracterización, inmovilización-estabilización y reactivación de una NADH oxidasa recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 (Tt27-NOX).	82
5. 3. 1. Clonaje y expresión en <i>E. coli</i> de la enzima Tt27-NOX	82
5. 3. 2. Purificación de la Tt27-NOX.	83
5. 3. 3. Caracterización de la Tt27-NOX.	84
5. 3. 3. 1. Producción de H ₂ O ₂ por la NOX.	84
5. 3. 3. 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble.	85
5. 3. 3. 3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble.	85
5. 3. 3. 4. Efecto del FAD y FMN exógeno sobre la actividad enzimática.	86
5. 3. 3. 5. Parámetros cinéticos.	87
5. 3. 3. 6. Efecto de la incubación de la Tt27-NOX a altas temperaturas.	88
5. 3. 3. 7. Caracterización de la estabilidad de la Tt27-NOX soluble.	90
5. 3. 4. Inmovilización y estabilización de la Tt27-NOX.	90
5. 3. 4. 1. Inmovilización de la Tt27-NOX mediante diferentes estrategias.	91
5. 3. 4. 2. Estabilización de la estructura cuaternaria.	92
5. 3. 4. 2. 1. Entrecruzamiento de la Tt27-NOX inmovilizada con dextrano-aldehído. Optimización del entrecruzamiento con dextrano-aldehído.	93
5. 3. 4. 3. Estabilidad térmica de la Tt27-NOX inmovilizada.	94
5. 3. 4. 4. Estabilidad de la Tt27-NOX inmovilizada frente a disolventes orgánicos.	96
5. 3. 5. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada.	97
5. 3. 5. 1. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada a altas concentraciones de agentes caotrópicos. Optimización de la reactivación.	97
5. 3. 5. 2. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada a altas temperaturas y pH ácido.	99
5. 3. 5. 3. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos.	100
5. 4. Expresión, purificación, caracterización e inmovilización-estabilización de diferentes variantes recombinantes de la NADH oxidasa de <i>Thermus thermophilus</i> HB27.	102
5. 4. 1. Expresión de las diferentes variantes de Tt27-NOX en <i>E. coli</i> . Secuencia de las variantes de la Tt27-NOX.	102
5. 4. 2. Purificación de las variantes de Tt27-NOX. Caracterización de la estabilidad térmica de las variantes de Tt27-NOX solubles.	103
5. 4. 3. Caracterización de las variantes de Tt27-NOX.	105
5. 4. 3. 1. Efecto del FAD/FMN exógeno sobre la actividad enzimática. Parámetros cinéticos.	105
5. 4. 3. 2. Efecto de la incubación de las variantes de Tt27-NOX a altas temperaturas.	106
5. 4. 4. Inmovilización de las variantes de Tt27-NOX sobre BrCN Sepharose®.	106
5. 4. 4. 1. Estabilidad térmica de Tt27-NOX inmovilizada sobre BrCN Sepharose®.	106

5. 5. Sistemas multi-enzimáticos inmovilizados aplicados a oxidaciones selectivas y reducciones asimétricas.	108
5. 5. 1. Procesos redox catalizados por dos biocatalizadores heterogéneos con regeneración de cofactor integrada en un solo reactor.	108
5. 5. 1. 1. Resolución cinética del (rac)-1-feniletanol mediante el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.	108
5. 5. 1. 2. Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona catalizada por el sistema el bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH.	109
5. 5. 1. 3. Resolución cinética dinámica del (rac)-2-fenilpropanal catalizada por el sistema el bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH.	111
5. 5. 2. Co-inmovilización racional de sistemas bi-enzimáticos en soportes porosos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración <i>in situ</i> del cofactor soluble.	113
5. 5. 2. 1. Co-inmovilización de diferentes sistemas bi-enzimáticos para el reciclaje de cofactores redox.	115
5. 5. 2. 2. Efecto de la co-inmovilización en la eficiencia oxidorreductora de los sistemas bi-enzimáticos.	121
5. 5. 2. 3. Efecto de la localización espacial de cada una de las deshidrogenasas a lo largo de la superficie porosa en la eficiencia de la regeneración <i>in situ</i> del cofactor.	123
5. 5. 2. 4. Impacto del exceso de enzima regeneradora en la eficiencia de la regeneración <i>in situ</i> del cofactor.	127
6. DISCUSIÓN.	129
6. 1. Purificación, caracterización, inmovilización-estabilización y reactivación de una alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 (Tt27-ADH2).	129
6. 1. 1. Expresión y purificación de la Tt27ADH2 recombinante.	129
6. 1. 2. Especificidad de sustrato de la Tt27-ADH2.	130
6. 1. 3. Caracterización bioquímica de la Tt27-ADH2.	132
6. 1. 4. Diseño de catalizadores heterogéneo de Tt27-ADH2 mediante estrategias de inmovilización.	133
6. 1. 5. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada.	135
6. 2. Purificación, inmovilización-estabilización de una glicerol deshidrogenasa recombinante de <i>Citrobacter braakii</i> (Cb-GyDH).	136
6. 2. 1. Diseño de catalizadores heterogéneo de Cb-GyDH mediante diferentes estrategias de inmovilización.	136
6. 2. 2. Estudio de la inhibición no competitiva.	137
6. 3. Purificación, caracterización, inmovilización-estabilización y reactivación de la Tt27-NOX recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27.	138
6. 3. 1. Expresión en <i>E. coli</i> de la Tt27-NOX (variante KHY) recombinante y purificación.	138
6. 3. 2. Caracterización bioquímica de la Tt27-NOX recombinante.	139
6. 3. 2. 1. Tt27-NOX es una oxidasa dependiente de cofactor de flavina y productora de H ₂ O ₂ .	139

6. 3. 2. 2. Perfil de temperatura y pH de Tt27-NOX (variante KHY).	140
6. 3. 2. 3. Análisis del efecto de las mutaciones en las propiedades catalíticas de las diferentes variantes de Tt27-NOX.	140
6. 3. 2. 4. La temperatura induce la hiperactivación de la Tt27-NOX en condiciones limitantes de cofactor de flavina.	145
6. 3. 3. Diseño de catalizadores heterogéneo de Tt27-NOX (variante KHY) mediante estrategias de inmovilización.	146
6. 3. 4. Reactivación en fase sólida del biocatalizador Tt27-NOX (variante KHY).	148
6. 4. Sistemas multi-enzimáticos inmovilizados aplicados a oxidaciones selectivas y reducciones asimétricas.	150
6. 4. 1. Procesos redox con regeneración de cofactor en un sólo reactor catalizados por dos biocatalizadores heterogéneos.	150
6. 4. 1. 1. Resolución cinética del (rac)-1-feniletanol mediante el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.	150
6. 4. 1. 2. Aplicación del catalizador heterogéneo de Tt27-ADH2 en reducciones asimétricas.	151
6. 4. 2. Co-inmovilización racional de sistemas bi-enzimáticos en soportes porosos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración <i>in situ</i> del cofactor soluble.	151
6. 4. 2. 1. Co-inmovilización de diferentes sistemas bi-enzimáticos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración <i>in situ</i> del cofactor soluble.	152
6. 4. 2. 2. La co-inmovilización de los sistemas bi-enzimáticos mejora la eficiencia de la regeneración de cofactor redox.	153
6. 4. 2. 3. La localización espacial de cada una de las deshidrogenasas a lo largo de la superficie porosa afecta a la eficiencia de la regeneración <i>in situ</i> del cofactor.	155
6. 4. 2. 4. La co-inmovilización del sistema tiene efecto en el impacto del exceso de enzima regeneradora en la eficiencia de la regeneración del cofactor.	158
7. CONCLUSIONES.	159

8. BIBLIOGRAFÍA.

ANEXOS.



Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo.
BCL	Beads crosslinked.
Biocatalizador 2-1	Sistema bi-enzimático formado por 2 enzimas co-inmovilizadas en el mismo soporte, es decir, co-localizadas dentro de la misma superficie porosa.
Biocatalizador 2-2	Sistema bi-enzimático formado por 2 enzimas inmovilizadas por separado, es decir, cada enzima inmovilizada en una superficie porosa diferente.
BrCN	Bromo cianógeno.
CAPS	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico.
Cb-GyDH	Glicerol deshidrogenasa de <i>Citrobacter braakii</i> .
CLSM	Microscopio láser confocal de barrido (Confocal Laser Scanning Microscopy).
DEAE	Dietilaminoetil.
Dex-COH	Dextrano aldehído.
DH	Deshidrogenasa.
DHA	Dihidroxiacetona.
Diglime	2-metoxietil éter.
DMSO	Dimetil sulfóxido
DS	Dextrano sulfato.
DTT	Ditiotreitol.
EDA	Etilendiamina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
<i>e.e</i>	Exceso enantiomérico.
Gox-GyDH	Glicerol deshidrogenasa de <i>Gluconobacter oxydans</i> .
IC50	Concentración de necesaria de un compuesto para inhibir la actividad enzimática un 50 %.
IDA	Ácido iminodiacético.
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (Immobilized-Metal Affinity Chromatography).
IPTG	Iso-propil-1-Tio-β-D-galactopiranósido.
FAD	Flavina adenina dinucleótido (forma oxidada).
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido (forma reducida).
FMN	Flavina adenina mononucleótido (forma oxidada).
FMNH₂	Flavina adenina mononucleótido (forma reducida).

FMN	Flavina adenina mononucleótido (forma oxidada).
FMNH₂	Flavina adenina mononucleótido (forma reducida).
FITC	Fluorescamina isotiocianato.
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta resolución).
MANAE	Mono-Aminoetil-N-etil.
NAD⁺	Nitotinamida adenosina dinucleótido (forma oxidada).
NADH	Nitotinamida adenosina dinucleótido (reducida).
NADP⁺	Nitotinamida adenosina dinucleótido fosfato (forma oxidada).
NADPH	Nitotinamida adenosina dinucleótido fosfato (forma reducida).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PEG600	Polietilenglicol de 600 Da.
PEI	Polietilenimina.
Ps-FDH	Formiato deshidrogenasa de <i>Pseudomonas</i> sp.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida condiciones desnaturalizantes (sódico dodecil sulfato-poli acrilamida gel electroforesis).
Sistema A	Sistema bi-enzimático formado por Gox-GyDH y Ps-FDH.
Sistema B	Sistema bi-enzimático formado por Cb-GyDH y Tt27-NOX.
Sistema C	Sistema bi-enzimático formado por Tt27-ADH2 y Tt27-GDH.
TEA	Trietilamina.
TFA	2,2',2''-trifluoroacetofenona.
THF	Tetrahidrofurano.
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TTN/TOF	Total turnover number/Turnover frequency.
Tt27-ADH1	Alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>Thermus thermophilus</i> HB27 (codificada por el gen TTC0002).
Tt27-ADH2	Alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27 (codificada por el gen TTC0331).
Tt27-GDH	Glutamato deshidrogenasa recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27 (codificada por el gen TTC1211).
Tt27-NOX	NADH oxidasa recombinante o nativa (cuando se indica) de <i>T. thermophilus</i> HB27.



Abstract

In many industrial fields such as fine chemistry, pharmacy, cosmetology, agriculture, food, etc., the need for safer and purer products leads to the use of exquisite selective processes. This goal may be achieved by exploiting enzymes as catalysts since their excellent properties. Enzyme technology in the last decades has enabled the enzyme to catalyze industrial reaction due to the numerous advances in enzyme isolation, production, purification, stabilization, as well as the great efforts done on process design to optimize their use. Dehydrogenases (DHs), which depend on nicotinamide cofactors, are among the most interesting enzymes in biocatalysis because they perform selective reductions and specific oxidations that may be key steps in the synthesis routes for fine chemicals, such as pharmaceuticals, food additives, etc. The search of new DHs has been enormously encouraged in the last times resulting in an increased number of available ones. On the other hand, due to the high costs of the nicotinamide cofactors, their stoichiometric use is not acceptable from an economical point of view. For these reasons industrial application of these enzymes requires efficient *in situ* replenishment of the concomitant cofactor in its right oxidation state. Therefore, the use of simple and low cost purification systems, the use of enzymes from thermophilic microorganisms and the development of cost-effective systems for nicotinamide cofactors regeneration would overcome some of the limitation of DHs in order to apply them industrially.

The main objective of this PhD Thesis project has been designing and developing bi-enzymatic systems using DHs with *in situ* enzymatic regeneration of the corresponding redox cofactors. These bi-enzymatic systems were formed by two DHs, one catalyzing the main reaction and the other acting as cofactor recycling partner. Thus, in this work has described the purification, characterization, stabilization by immobilization on solid supports and the reactivation of two new DHs from *Thermus thermophilus* HB27 recombinantly expressed in *E.coli*: an alcohol dehydrogenase (Tt27-ADH2) and NADH oxidase (Tt27-NOX).

In one hand, the new short-chain alcohol Tt27-ADH2 has been described to catalyze both oxidative and reductive reactions at neutral pH with a broad range of substrates. Its highest activity was found towards the reduction of 2,2',2''-trifluoroacetophenone (85 U/mg). Moreover, the enzyme was stabilized more than 200-fold by multipoint covalent immobilization on agarose matrixes *via* glyoxyl chemistry. Such heterogeneous catalyst was coupled to an immobilized cofactor recycling partner performed the quantitative reduction of 2,2',2''-trifluoroacetophenone and (*rac*)-2-phenylpropanal to (*S*)-(+)- α -(trifluoromethyl)benzyl alcohol and (*2R*)-phenyl-1-propanol with enantiomeric excesses of 96 % and 90% respectively. Such activity at low temperature along its anti-prelog selectivity for pro-chiral aryl-ketones and its preference for the (*R*)-2-phenylpropanal enhances its potential use as selective catalyst under mild operation conditions often required in fine chemistry.

On the other hand, the Tt27-NOX is a flavoenzyme which needed exogenous flavin cofactor (FAD or FMN) to reach its optimal performance. Interestingly, this enzyme presented a catalytic efficiency 6-fold higher than its counterpart in strain HB8. This enzyme also performs redox reaction at low temperatures showing high specific activity values (70 U/mg) despite being isolated from a thermophile source. Immobilization of Tt27-NOX on agarose matrixes *via* glyoxyl chemistry yielded the most stable enzyme preparation (until 300-fold more stable than soluble enzyme). The immobilized derivative was able to be reactivated under physiological conditions after inactivation by high solvent concentrations. The heterogeneous and robust biocatalyst was used as recycling partner in the kinetic resolution of (*rac*)-1-phenylethanol. The high stability along with its capability to be reactivated makes this biocatalyst suitable for cofactor recycling in redox biotransformations.

In this work, we also purified and stabilized a recombinant glycerol dehydrogenase from *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH). The enzyme oxidizes glycerol to dihydroxyacetone with a specific activity of 65 U/mg but undergoes a strong non-competitive inhibition by low concentrations of the corresponding oxidation product. The immobilized enzyme on agarose heterofunctionally activated with both glyoxyl and metal chelate groups showed an inhibition 1.7 times lower than its soluble counterpart. Moreover, this immobilized preparation was up to 90-fold more stable than the soluble form.

Finally, we have optimized bi-enzymatic redox systems using different enzyme immobilization strategies in order to minimize the amount of soluble cofactor needed to perform different bio-redox reactions. The two main approaches used in this work were: the immobilization of each enzyme involved in the bi-enzymatic system on two different carriers, and the co-immobilization of the two enzymes on the same carrier. In this regard, we also optimize the enzyme distribution within the porous structure of the co-immobilized biocatalysts. In all cases, the co-immobilization of the two protein results in better cofactor recycling efficiencies than when the two enzymes were separately immobilized on two different carriers. In principle, a system where both enzymes are co-immobilized seems to be more favorable for efficiently regenerating the cofactor pool in its right oxidation state. Nevertheless, the co-immobilization itself does not guarantee the success of the bi-enzyme system. Hence, we have optimized the co-immobilization chemistry for each of the three bio-redox systems here studied. For one specific case (one thermophilic system), NADH is recycled 4600 times using 50 μ eq of cofactor per equivalent of substrate at 55 °C. Moreover, it has been found that uniform distribution of both DHs across the porous surface enhances the cofactor recycling by 1.5-fold factor, likely because of vicinal cooperation effects. Therefore, the rational design of the co-immobilization strategy of different bioredox systems formed by two enzymes may be extended to other biocatalytic cascades, opening a window for the optimization of others multi-enzyme biotransformations where cofactor recycling is needed.



Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 QUÍMICA SOSTENIBLE Y BIOCATÁLISIS.

La química verde o también denominada sostenible es el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y generación de sustancias peligrosas (Anastas et al., 2001). Las nuevas demandas, los nuevos conceptos y criterios que deben considerarse en la toma de decisiones, tanto a nivel de ciencia básica de desarrollo, como a nivel de escala técnica de diseño o a nivel de implantación industrial, quedan recogidos en los doce principios de la química sostenible (Anastas and Kirchhoff, 2002; Anastas and Zimmerman, 2003), derivados de los cuales cabe considerar:

- Importancia de la prevención.
- Diseño de metodologías que maximicen la incorporación en el producto final de todos los materiales usados en el proceso.
- Los métodos sintéticos deberían ser diseñados para utilizar y generar sustancias que posean poca o nula toxicidad para el medio ambiente y el ser humano.
- Los productos químicos deberían ser diseñados para preservar su eficiencia de función mientras se reduce su toxicidad.
- No debería ser necesario el uso de sustancias auxiliares (solventes, etc.) o si se utilizan deberían ser inocuas.
- Eficiencia energética. Los requerimientos energéticos deberían ser reconocidos por su impacto económico y medio ambiental, y deberían ser minimizados (síntesis a presión y temperatura ambiente).
- Uso de materiales renovables.
- Las derivatizaciones (bloqueo de grupos, protección/desprotección, modificaciones temporales de procesos químicos o físicos) deberían evitarse siempre que sea posible.
- Los reactivos catalíticos (tan selectivos como sea posible) son superiores a reactivos estequiométricos. La catálisis es clave para minimizar la producción de residuos.
- Los productos químicos deberían diseñarse para que al final de su función no persistan en el medio ambiente y se descompongan en productos inocuos (biodegradabilidad).
- Es necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan monitorizar y controlar, en tiempo real, los procesos químicos antes de que se formen las posibles sustancias peligrosas.
- Importancia de la seguridad. Las sustancias y las formas de las sustancias utilizadas en los procesos químicos deberían elegirse de modo que minimicen los potenciales accidentes químicos, que pudieran producirse.

En definitiva se trata lograr aplicar una química para un desarrollo sostenible, un modelo de química demandado en química fina, farmacéutica, cosmética, alimentación, etc., basado en una alta eficiencia de los procesos y en una alta calidad de los productos.

Los doce principios de la química verde identifican a la catálisis como una de las herramientas más importantes para poder implementarla (Anastas et al., 2001; Sheldon, 1997, 2007a). La catálisis heterogénea, en particular, cumple con más objetivos de la química verde como son la facilidad de separación de productos y catalizadores, eliminando la necesidad de la separación por destilación o extracción.

Dentro de la catálisis, la biocatálisis ofrece una serie de características que inciden y enfatizan en aspectos clave de la catálisis como herramienta clave para llevar a cabo una química sostenible (Leresche and Meyer, 2006; Patel, 2006; Wohlgemuth, 2010a, Woodley, 2008). Las credenciales verdes de la biocatálisis son (Woodley, 2008):

- Operar en agua, reemplazando disolventes orgánicos, y presiones suaves (reducción del gasto energético).
- Alta selectividad, incluyendo regio y estereoselectividad (alta eficiencia material).
- Operan en condiciones suaves, evitando la necesidad de protección (alta eficiencia material).
- Reduce el uso de materiales peligrosos.
- Uso de fuentes renovables.
- Las propiedades de los biocatalizadores pueden ser alterados para mejorar el proceso.
- Raramente son procesos endo o exotérmicos (reduciendo requerimientos energéticos).
- Alto rendimiento por la selectividad y las condiciones suaves de reacción (mejora fácilmente la eficiencia del proceso).
- Es más catalítico que estequiométrico, mejorando fácilmente el proceso.

Así, los catalizadores biológicos, es decir las enzimas, son catalizadores que se caracterizan por (Faber, 2006; Leresche and Meyer, 2006):

- Tener una alta actividad catalítica en condiciones suaves de reacción. Sus condiciones óptimas de trabajo, generalmente, son: temperatura ambiente, presión atmosférica, medio acuoso y pH neutro.
- Son altamente específicas, catalizan una reacción química entre muchas posibles.
- Son quimio, regio y enantioselectivas.

Por tanto, las enzimas son candidatos casi ideales para ser catalizadores de uso industrial, capaces de sintetizar compuestos muy complejos, compatibles con las exigencias alta eficacia, eficiencia de los procesos químicos y de la química sostenible. Es interesante destacar, que debido a la naturaleza intrínseca quiral de las enzimas, son catalizadores idóneos para la síntesis y obtención de productos en química fina y farmacéutica con una alta pureza óptica, y la producción de intermediarios enantioméricamente puros activos en áreas de demanda vigente y creciente en la industria química, como por ejemplo, en la industria farmacéutica (Panke et al., 2004; Patel, 2006; Straathof et al., 2002; Thomas et al., 2002; Woodley, 2008).

1. 2. QUIRALIDAD Y SU IMPORTANCIA.

Antes de hablar de la quiralidad y de su importancia es necesario definir algunos conceptos muy importantes en catálisis como son quimio, regio y estereoselectividad. Según el glosario de la IUPAC (Muller, 1994):

La quimioselectividad es la preferencia de un reactivo para reaccionar en particular con uno de entre dos o más grupos funcionales diferentes. También se puede aplicar el término quimioselectividad cuando un grupo funcional en una molécula reacciona de forma selectiva o diferente frente a distintos reactivo o condiciones de reacción.

La regioselectividad es la preferencia que tiene una reacción para romper o crear un enlace en particular por encima de todos los demás posibles.

Estereoselectividad es la formación preferencial en una reacción química de un estereoisómero sobre todos los posibles. Puede ser parcial, donde la formación de un estereoisómero está favorecida sobre el resto, o puede ser total, cuando sólo se forma un estereoisómero de entre los posibles. Cuando los estereoisómeros son enantiómeros, el fenómeno se denomina enantioselectividad y se expresa cuantitativamente mediante el exceso enantiomérico (*e.e*); cuando son diastereoisómeros, se denomina diastereoselectividad y es expresado cuantitativamente como exceso diastereoisomérico.

La quiralidad (del griego kéir: mano) es la propiedad de un objeto de no ser superponible con su imagen especular. La quiralidad es una característica universal e intrínseca en casi todos los niveles de la materia. En particular, la vida depende de la quiralidad molecular, en donde muchas funciones biológicas son inherentemente asimétricas. Debido a esto, moléculas con estas características juegan un papel muy importante en la ciencia y la tecnología (Noyori, 2002).

Los enantiómeros son moléculas quirales, las dos formas enantiómeras, en principio, tienen las mismas propiedades fisicoquímicas. Esta relación quiral entre moléculas, no tiene repercusión en la mayoría de las propiedades fisicoquímicas, excepto en la interacción con la luz polarizada en un plano: un isómero desvía el plano de polarización hacia la derecha, mientras el otro isómero desvía en la dirección contraria dando origen a enantiómeros dextrógiros y levógiros. Por ellos, también se les denomina isómeros ópticos. La diferencia estructural entre enantiómeros puede ser muy importante con respecto a la acción de fármacos sintéticos. Por ejemplo, el (*S-S*) etambutol es un fármaco contra la tuberculosis mientras que el enantiómero (*R-R*) causa ceguera; la forma *R* de la talidomida es un sedante mientras que el otro enantiómero produce malformaciones en los niños cuyas madres hubieran tomado este medicamento durante el embarazo. El receptor quiral de un ser humano solo interactúa con moléculas con una determinada configuración absoluta, lo cual puede dar como resultado marcadas diferencias en la actividad farmacológica de los enantiómeros.

Desde hace algunos años se están introduciendo compuestos ópticamente puros porque, por lo general, sólo uno de los enantiómeros posee la actividad apropiada mientras que las otras formas pueden tener propiedades muy diferentes e incluso peligrosas. Además, la actividad de un compuesto ópticamente puro es a menudo mayor que la mezcla racémica y también es común que la separación de dos

enantiómeros sea difícil, por lo que es mejor utilizar un síntesis altamente selectiva (Devaux-Basseguy et al., 1997).

En la actualidad existen tres estrategias principales para obtener isómeros enantioméricamente puros (Keith et al., 2001): a partir de fuentes naturales (baja concentración de este tipo de moléculas y difícil purificación), resolución de mezclas racémicas y métodos asimétricos (síntesis enantioselectiva). En cuanto a los métodos asimétricos existen tres metodologías para llevar a cabo reacciones asimétricas como son el uso de auxiliares quirales, reactivos quirales o catálisis enantioselectiva (o asimétrica).

Por otra parte, otro método para obtener isómeros enantioméricamente puros es la resolución cinética de mezclas racémicas (abreviada en inglés como KR), que consiste en la conversión selectiva de uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica en otro compuesto. Las enzimas han sido ampliamente empleadas en la resolución de mezclas racémicas, sin embargo, el rendimiento máximo de una KR es de sólo el 50 %, ya que un enantiómero da lugar al producto deseado mientras que el otro no reacciona, lo que hace a este proceso económicamente y ecológicamente poco atractivo a menos que el enantiómero no deseado pueda reciclarse fácilmente. En este contexto, la resolución cinética dinámica (abreviada en inglés como DKR) puede solucionar esta limitación. El proceso de DKR combina la resolución cinética y la racemización *in situ* del enantiómero sin reaccionar de modo que puede sobrepasarse el 50 % de rendimiento máximo de la KR clásica siempre que la tasa de racemización compite con éxito con la de la reacción de resolución.

Típicamente, se han utilizado lipasas en reacciones de esterificación o hidrólisis en DKRs con altos rendimientos y condiciones suaves de reacción. Las deshidrogenasas se han empleado con menos frecuencia debido a los siguientes inconvenientes: 1) limitación del número de enzimas puras disponibles comercialmente; 2) por lo general, poseen una limitada estabilidad y actividad en presencia de disolventes no acuosos; y 3) los requerimientos para el cofactor y su sistema de regeneración asociado incrementan la complejidad de la reacción. Sin embargo, recientemente se han aplicado deshidrogenasas y carbonil reductasas, particularmente en reacciones de reducción, con una buena productividad (Galletti et al., 2010; Nestl et al., 2011).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han utilizado diferentes estrategias como la catálisis asimétrica como método para obtener compuestos enantioméricamente puros mediante el uso de enzimas como catalizadores quirales, así como, oxidaciones selectivas, resoluciones cinéticas (KR) y resoluciones cinéticas dinámicas (DKR) de mezclas racémicas.

1. 3. BIOCATÁLISIS EN LA INDUSTRIA. CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES.

La industria biotecnológica ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años, de este modo, varios estudios de mercado preveían que en 2010 supusiese entorno a un 20 % (310 billones de dólares) del volumen total de ventas de la industria química. Dentro de este mercado los compuestos químicos de alto valor añadido y sobre todo los compuestos utilizados en química fina representaban los mercados más importantes. Por ejemplo, la producción de penicilina por *Penicillium chrysogenum* supone un mercado de 1,5 billones de dólares al año. Mientras que vitaminas como la producción de ácido L-ascórbico por *Gluconobacter oxydans*, supone un mercado de 600 millones de dólares al año (Tao et al., 2009).

En muchas ocasiones la combinación de procesos químicos y biológicos da lugar a rendimientos más altos, menor producción de deshechos y reducción de costes (Tao et al., 2009). Por ejemplo, en la conversión de progesterona a 11- α -OH-progesterona (por el hongo *Rhizopus* sp.) basada en un paso de hidroxilación directa y otro compuesto de partida, se consiguió pasar de un proceso químico de 30 pasos a un proceso mucho más verde de 15 pasos químico-biológicos reduciendo los costes en un factor de 50 (Tao et al., 2009). Otro ejemplo es el anti-hipertensivo Lipitor® (atorvastatina) un fármaco cuya ventas anuales suponen 10 billones de dólares. La síntesis biocatalítica de los intermediarios quirales de atorvastatina emplea una gran variedad de biocatalizadores tales como deshidrogenasas, halohidrina deshalogenasa, aldolasas, nitrilasas y lipasas. Por tanto, la habilidad de los biocatalizadores de convertir compuestos aquirales baratos en intermediarios farmacéuticos de alto valor hace de la biocatálisis una importante herramienta para la industria farmacéutica.

Actualmente, la biocatálisis no sólo se aplica ampliamente en la industria farmacéutica, sino también en otros campos. En la industria cosmética y alimentaria se producen biotecnológicamente, vitaminas, sabores, fragancias, cremas hidratantes, compuestos anti-envejecimiento, aditivos alimentarios mediante fermentaciones, sistemas multi-enzimáticos o sistemas de enzimas aisladas. Además, hoy en día en la industria química fina hay establecidos procesos químicos catalizados por enzimas que incluyen reacciones de hidrólisis, esterificación, reducción de cetonas, oxidaciones, epoxidaciones, formación de amidas, síntesis asimétrica de aminas desde cetonas proquirales, etc. (Wenda et al., 2011).

Los numerosos procesos biocatalíticos industriales establecidos en la actualidad son llevados a cabo por biocatalizadores en forma de células enteras o en forma de enzimas aisladas (Wichmann and Vasic-Racki, 2005). El uso de enzimas aisladas como biocatalizadores ofrece algunas ventajas en comparación con la utilización de células enteras. La principal desventaja de utilizar células enteras es que el propio metabolismo celular, difícil de controlar, puede dar lugar a productos secundarios no deseados, sobre todo al emplear grandes volúmenes y una gran biomasa. Además, suelen presentar baja actividad catalítica y poca tolerancia a los disolventes orgánicos, en ocasiones, imprescindibles para poder solubilizar los sustratos (Berenguer-Murcia and Fernandez-Lafuente, 2010; Faber, 2006). Si se resuelven problemas como la estabilidad de la enzima, reciclaje del cofactor y el reuso durante varios ciclos de reacción, el uso de enzimas aisladas puede ser ventajoso. Mediante el uso de enzimas aisladas

inmovilizadas conseguimos mejorar la estabilidad, aparecen menos limitaciones difusionales con respecto a las células enteras, facilitar la separación y recuperación del biocatalizador y producto, prolongar la vida útil del mismo y evitar reacciones laterales no deseadas. La decisión de aplicar uno u otro sistema dependerá de los requerimientos específicos del sistema de reacción industrial (Goldberg et al., 2007a; Goldberg et al., 2007b).

Las enzimas son los catalizadores de los sistemas biológicos, que como tal, sufren un proceso de evolución natural que les hace adaptarse y adecuarse a las características y exigencias que les vienen dadas por su función en dichos sistemas, es decir, las enzimas son generalmente:

- Inestables fuera de sus ambientes habituales de trabajo.
- Presentan su mayor actividad catalítica en las condiciones fisiológicas.
- Son inhibibles por sustratos y productos.
- Están preparadas para actuar sobre sustratos naturales.
- Como catalizadores altamente específicos están presentes de forma minoritaria en los organismos.
- Son catalizadores solubles. Actúan en fase homogénea acuosa.

Por consiguiente, para su uso como catalizadores industriales, las enzimas deberían presentar una serie de requisitos (Leresche and Meyer, 2006; Schmid et al., 2002; Wohlgemuth, 2010b):

- Deben ser catalizadores suficientemente estables, en las condiciones definidas por el proceso, para poder ser utilizadas durante tiempos prolongados o durante un número suficiente de ciclos de reacción (así, minimizaríamos el coste total del catalizador).
- Deben presentar su actividad catalítica en un rango más amplio de condiciones que las fisiológicas, para poder ser susceptibles de uso en las condiciones exigidas.
- No deberían ser inhibibles por sustratos y productos.
- Deberían poder actuar tanto sobre sustratos naturales como no naturales.
- Para el diseño del catalizador y del proceso sería deseable contar con enzimas puras (para evitar reacciones laterales indeseadas) y en cantidad suficiente para poder preparar catalizadores con una carga enzimática acorde con las necesidades del proceso.
- Para el diseño y funcionamiento de un reactor biocatalítico sería deseable poder disponer de catalizadores enzimáticos insolubles que actúen en fase heterogénea.

En definitiva, las enzimas han de ser mejoradas para su uso industrial. De entre las técnicas que pueden mejorar las propiedades catalíticas (actividad, estabilidad y selectividad) de las enzimas y su estabilidad se encuentran las técnicas de inmovilización.

1. 4. ENZIMAS DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS.

Las enzimas de microorganismos termófilos (crecimiento entre 60-80°C) son muy interesantes como biocatalizadores, por su termoestabilidad, que está asociada a una alta resistencia a la proteólisis, a la inactivación en presencia de disolventes orgánicos, a su resistencia a otros agentes químicos desnaturizantes, a la posibilidad de almacenar durante tiempos prolongados y a reducir el riesgo de contaminación durante los procesos. Esta estabilidad es más alta que en sus homólogos mesófilos (Cowan, 1997; Daniel and Cowan, 2000; Turner et al., 2007) y existe diversos factores que contribuyen a ella como son:

- a) Estabilización de las hélices (baja frecuencia de amino ácidos ramificados C β como Val, Ile, Thr; amino ácidos específicos al final de la hélice como Pro).
- b) Interacciones estabilizadoras en la proteína plegada (puentes de hidrógeno y salinos, interacciones hidrofóbicas, aromáticas, etc.).
- c) Interacciones estabilizadoras entre dominios y subunidades.
- d) Densidad del empaquetamiento (por ejemplo, incremento de la hidrofobicidad del núcleo).
- e) Estabilidad de la superficie expuesta al medio (bajo nivel de amino ácidos propensos a desamidación, como Gln y Asn, o degradación oxidativa, como Cys o Met).

Sin embargo, en muchas ocasiones estas enzimas presentan una baja actividad a temperaturas mesófilas, condiciones donde la estabilidad de la mayoría de sustratos es la adecuada, reduciendo su interés (Wood et al., 1995). Por ello, es importante el descubrimiento (mediante metagenómica, secuenciación de genomas, etc) de nuevas enzimas termoestables muy activas en combinación con su producción recombinante y el desarrollo de técnicas de evolución dirigida y mutaciones puntuales. La termoenzima más importante que se aplica hoy en día es la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* que en 2005 tenía un mercado estimado de 282 millones de € (Cava et al., 2009).

Centrándonos en el género *Thermus* las cepas HB8 y HB27 de *T. thermophilus* están siendo muy estudiadas y sus secuencias están disponibles (<http://www.thermus.org>) (Stothard et al., 2005). Se pueden encontrar enzimas ya descritas que se aplican hoy en día o tienen una aplicación potencial (Cava et al., 2009; Henne et al., 2004; Lasa and Berenguer, 1993; Pantazaki et al., 2002), como por ejemplo: en biología molecular (ADN polimerasas, ARN polimerasas, ADN ligasas, enzimas de restricción), procesamiento de almidón (α -amilasas y glucosa isomerasas), industria papelera (xilanasas), industria alimentaria (β -glucosidasas, α y β -galactosidasas), síntesis orgánica (proteasas, peptidasas, lipasas, esterasas, L-Asparaginasas, oxidorreductasas), biosensores (oxidorreductasas) y enzimas que participan en la síntesis de cobalamina (vit. B12). Cabe destacar que el número de patentes relacionadas con *Thermus* spp. ha ido creciendo a lo largo de estos últimos años, siendo un 33% de ellas referentes a polimerasas, 19% a procesos, 7% a bioproductos y 41% a otras enzimas, entre ellas deshidrogenasas (DHs).

1. 5. OXIDORREDUCTASAS: DESHIDROGENASAS.

1. 5. 1. Generalidades.

En muchos campos de la industria, como química fina, farmacéutica, agrícola, alimentaria, cosmética, etc., la necesidad de productos seguros y puros conduce, cada vez más, al uso de procesos selectivos. Este incremento en la especificidad podría alcanzarse explotando las enzimas como catalizadores gracias a los numerosos avances en el aislamiento, producción, purificación y estabilización, y a los grandes esfuerzos en el diseño de procesos para optimizar su uso.

Las oxidorreductasas (Devaux-Basseguy et al., 1997; Goldberg et al., 2007a; Hummel, 1999) representan una cuarta parte de las enzimas conocidas y son un tipo de enzimas que catalizan oxidaciones y reducciones de grupos funcionales presentes en las moléculas, es decir, la modificación del estado de oxidación de un átomo o grupo funcional mediante una transferencia de electrones. En función del tipo de transformación concreta a la que dan lugar existen varios grupos de oxidorreductasas: oxidasas, oxigenasas, monooxigenasas y deshidrogenasas (DHs). En la **Figura 1. 1** puede observarse la clasificación de las oxidorreductasas en función de su aplicación en química analítica y sintética (Monti et al., 2011).

Las oxidorreductasas tienen un amplio espectro de aplicaciones (véase **Tabla 1. 1**) (Devaux-Basseguy et al., 1997; Huisman et al., 2010; Hummel, 1999; Patel, 2008; Woodley, 2008) como en: síntesis de compuestos quirales, reducciones enantioselectivas, a partir de un sustrato proquiral para obtener solamente uno de los dos enantiómeros posibles; síntesis de hidroxiácidos y de aminoácidos; síntesis quimio, regio y enantioselectiva de alcoholes, aldehídos y cetonas, a través del reconocimiento de un solo grupo funcional de la molécula entre varios posibles, realizando una sola transformación química hacia solamente un enantiómero; funcionalización de esteroides naturales; preparación y modificación de polímeros, especialmente polímeros biodegradables o biocompatibles; biosensores para una variedad de aplicaciones analíticas y clínicas; y la degradación de contaminantes orgánicos. Debido a su alta eficiencia y especificidad estas enzimas son particularmente atractivas para biosíntesis (Liu and Wang, 2007).

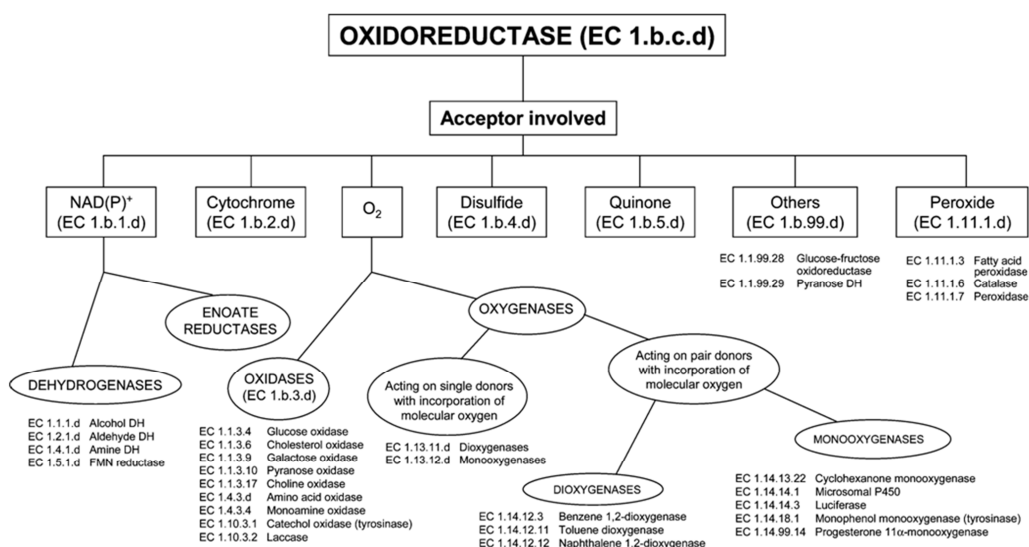


Figura 1. 1. Clasificación de oxidorreductasas que tienen aplicación en química analítica o sintética (Monti et al., 2011).

La principal característica de estos biocatalizadores es que precisan, para mostrar su actividad catalítica, la presencia de cofactores redox, que son realmente los oxidantes y reductores de los sustratos (Devaux-Basseguy et al., 1997). Estos cofactores redox o coenzimas son consumidos estequiométricamente en las reacciones catalizadas por estas enzimas y son necesarios para que la enzima muestre su actividad catalítica. En las DHs estos cofactores no están unidos covalentemente a la proteína sino que los reconoce y los fija en el centro activo solamente en el momento de la reacción y posteriormente pasa a la disolución. Durante la oxidación-reducción que cataliza la DH el cofactor sufre una transformación concomitante en sentido inverso, reducción-oxidación respectivamente, de tal forma que pasa a la disolución en una forma inactiva en el sentido de la reacción deseada. El uso de enzimas asiladas exige el uso del cofactor como sustrato, y como mínimo, en cantidades estequiométricas o el diseño de un sistema de regeneración del mismo.

Biocatalizador	Producto	Aplicación	Compañía/escala producción
Lactato DH de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Ácido (R)-3-(4-fluorofenil)-2-hidroxipropiónico	Inhibidor de proteasa de Rhinovirus (Rupintrivir)	Pfizer Inc./ Kg
DH de <i>Geotrichum candidum</i>	Ácido (S)-4-Chloro-3-hidroxibutanoico metil éster	Síntesis de antagonistas del colesterol que inhiben la hidroximetil glutaril CoA reductasa	Bristol-Myers Squibb/ Kg
Leucine DH de <i>Bacillus sphaericus</i> / Formiato DH de <i>Candida boidinii</i>	L-tert-leucina	Anti-tumorales o inhibidores de proteasas del SIDA	Degussa AG/ t
DH de <i>Candida sorbophila</i>	(R)-N-(2-hidroxil-2-piridina-3-il-etil)-2-(4-nitro-fenil)-acetamida	Síntesis de agonistas β -3. Terapia contra obesidad, hipertensión, diabetes tipo 2 y enfermedades coronarias.	Merck & Co., Inc./ Kg
Fenilalanina DH de <i>Thermoactinomyces intermedius</i> / Formiato DH de <i>Candida boidinii</i>	Ácido (S)-2-amino-5-(1,3-dioxalan-2-il-pentanoico	Antihipertensivo (Omapatrilat)	Bristol-Myers Squibb/ nd
D-amino ácido oxidasa de <i>Trijonopsis variabilis</i>	Ácido N- α -ceto adipinil-7-aminocefalosporánico	7-ACA , intermediario para cefalosporinas semi-sintéticas	Sandoz AG/200 (t/año)
Monooxigenasa / Aril alcohol DH / Benzaldehído DH de <i>Pseudomonas putida</i>	Ácido 2-quinoxalina carboxílico	Síntesis de compuestos biológicamente activos (WO Patent 2001034600, 2001. WO Patent 9926927, 1999. JP Patent 09328428, 1997).	Pfizer Inc./ nd
Estireno monooxigenasa de <i>E. coli</i>	Óxido (S)-estireno	Precusores de un amplio rango de productos	DSM/ nd

Tabla 1. 1. Ejemplos de procesos biocatalíticos industriales establecidos donde se utilizan oxidorreductasas.

Los sistemas vigentes donde se utilizan DHs se caracterizan por (Leonida, 2001; Wandrey, 2004): baja estabilidad de las enzimas, dependencia del cofactor, necesidad de sistemas de regeneración,

mejora de la selectividad y de la especificidad de los sistemas que usan deshidrogenasas. Por tanto, se necesitan nuevas enzimas, existentes en la naturaleza o modificadas en el laboratorio, muy selectivas en sus transformaciones, muy activas y fácilmente purificables.

1. 5. 2. Aplicaciones de las deshidrogenasas.

Como ya se ha comentado una DH cataliza la reacción reversible de oxidación de un alcohol o reducción de una cetona o aldehído. Desde el punto de vista del interés de aplicación de las DHs, pueden dividirse en dos usos o reacciones principales: oxidación específica de alcoholes y reducciones enantioselectivas.

Oxidaciones específicas: una alcohol deshidrogenasa (ADH) puede reconocer un grupo funcional alcohol entre varios posibles en una molécula compleja para dar lugar a una oxidación específica, o reconocer un solo enantiómero de una mezcla racémica de alcoholes secundarios para dar lugar a una oxidación específica (Burton, 2003; Kroutil et al., 2004a; Kroutil et al., 2004b). Por tanto las oxidaciones catalizadas por DHs tienen interés en: resolución de mezclas racémicas de alcoholes y aminas, síntesis de cetonas de difícil preparación útiles para la preparación de isómeros no naturales, oxidación selectiva de alcoholes, asimetrización de dioles proquirales o meso dioles. Por cada mol de sustrato oxidado tiene lugar la reducción de un mol de cofactor NAD(P)^+ a NAD(P)H . La aplicación de las DHs en estas estrategias permite dar lugar a oxidaciones mediante la transferencia de hidruro con las características propias de los sistemas biocatalíticos: (a) es una oxidación muy suave, en disolución acuosa, temperatura ambiente, y presión atmosférica; (b) de alta eficiencia energética y absolutamente idónea en la oxidación de moléculas complejas y lábiles, que pudieran descomponerse con otros procedimientos de oxidación; (c) es una oxidación muy específica, apta e idónea para realizar oxidaciones concretas en rutas en química fina muy complejas; (d) es intrínsecamente enantioselectiva, capaz de reconocer un solo enantiómero; (e) se caracteriza por la ausencia de reacciones laterales y alta especificidad en el producto obtenido.

Reducciones enantioselectivas: una DH es capaz de reconocer un determinado grupo carbonilo (un aldehído o cetona) concreto y reducirlo para dar lugar a un alcohol, es decir, a un solo enantiómero en el caso de ser un alcohol enantiomérico (Goldberg et al., 2007a; Kaluzna et al., 2005; Nakamura and Matsuda, 2003, 2006; Sorgedrager et al., 2008). Por tanto las reducciones catalizadas por DHs tienen interés en: preparación de alcoholes secundarios, enantioméricamente puros, en moléculas alifáticas, cíclicas o aromáticas que son interesantes precursores en química fina y farmacéutica. En este caso, por cada mol de sustrato reducido tiene lugar la oxidación de un mol de cofactor NAD(P)H a NAD(P)^+ . La aplicación de las DHs en estas estrategias permite obtener las ventajas características de los sistemas biocatalíticos: es una reducción absolutamente selectiva (químico, regio y enantioselectiva) y es una reducción muy suave.

Características y limitaciones. La aplicabilidad de las DHs en las rutas de preparación y síntesis quiral está limitada y depende, fundamentalmente (Leonida, 2001; Wandrey, 2004) de: (a) baja

estabilidad de las enzimas, (b) baja estabilidad del sistema global, (c) variabilidad del rendimiento, altos tiempos de reacción, altos costes, (d) nuevos catalizadores: enzimas capaces de realizar nuevas transformaciones, (e) diseño de catalizadores estables, eficientes, susceptibles de dar versatilidad al diseño de los reactores, (f) necesidad de diseñar y aplicar un sistema de regeneración eficiente, estable, simple, barato y limpio.

Las ADHs pueden subdividirse con respecto a varios criterios (Hummel, 1997, 1999) de los cuales dos presentan una relevancia particular para su aplicación en procesos biotecnológicos: el primero de ellos es a partir de los datos estructurales y químicos de la proteína (tamaño de las sub-unidades y necesidad de iones metálicos) y el segundo en función del mecanismo estereoquímico de la reacción. A partir del primer criterio, las ADHs se pueden sub-clasificar en tres categorías: las de cadena media conteniendo zinc (350 aminoácidos por sub-unidad, ejemplo, ADH de *Thermoanaerobium brockii*), las de cadena corta sin ningún metal (250 aminoácidos por sub-unidad, ejemplo, ADH de *Lactobacillus kefir*) y las de cadena larga conteniendo hierro (385 aminoácidos por sub-unidad, ejemplo glicerol deshidrogenada de *Bacillus stearothermophilus*). A partir del segundo criterio, las ADHs se pueden sub-clasificar en cuatro categorías (véase **Figura 1. 2**). Las E_1 que transfieren el hidruro pro- R de la coenzima, atacando al sustrato por la cara Si ; las E_2 que transfieren el hidruro pro- S de la coenzima, atacando al sustrato por la cara Si ; E_3 las que transfieren el hidruro pro- R de la coenzima, atacando al sustrato por la cara Re y las E_4 que transfieren el hidruro pro- S de la coenzima, el cual ataca al sustrato por la cara Re . Las enzimas de los grupos E_1 y E_2 dan como resultado la formación de (R)-alcoholes, mientras que las enzimas de los grupos E_3 y E_4 , los (S)-alcoholes (Pennacchio et al., 2010a).

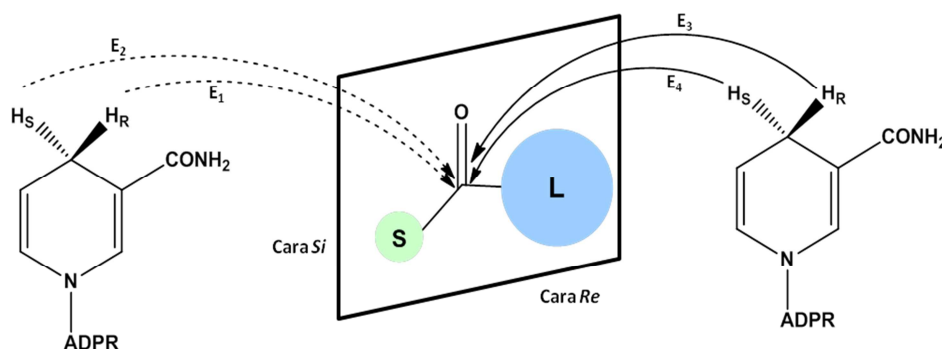


Figura 1. 2. Estereoquímica de la transferencia del hidruro desde el NAD(P)H al grupo carbonilo del sustrato. S: grupo pequeño; L: grupo grande.

La dirección estereoquímica preferida del ataque hidruro (patrón E_3 y E_4) puede ser predicha por una regla empírica simple conocida como regla de Prelog. Esta regla se basa en la idea de que el volumen estérico relativo de los grupos unidos al carbono carbonilo (S para grupos pequeños y L para grupos grandes, **Figura 1. 2**) gobierna el curso de la reacción. Si los grupos S y L son simples como sustituyentes alquilo o arilo, la cara preferente del ataque coincide con el carbonilo de la cara Re . La transferencia del hidruro pro- S o pro- R por la cara Si de una cetona proquiral lleva a la formación de un alcohol de configuración anti-Prelog (E_1 y E_2).

1. 6. COFACTORES DE NICOTINAMIDA Y FLAVINA: NAD(P)H, FAD y FMN.

Una de las primeras cuestiones a considerar en la aplicación de DHs aisladas (y monooxigenasas) es el hecho de que los cofactores nicotinamida, es decir, β -nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+), β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), y β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), son consumidos estequiométricamente en las reacciones catalizadas por estas enzimas. De este modo, debido a su alto coste es necesario que los cofactores se regeneren continuamente en el medio de reacción (regeneración *in situ*), para que puedan ser empleados en cantidades catalíticas y no estequiométricas.

Cofactores tipo NAD(P)H. Estos cofactores de nicotinamida (**Figura 1. 3**) son moléculas que almacenan poder redox e intervienen como intermediarios de electrones en las sistemas vivos. No están unidos a las enzimas permanentemente, sino que se disocian después de ejercer su función redox. El NAD(H) suele intervenir en la ruta de la respiración, en el transporte electrónico hasta oxígeno molecular como aceptor final, mientras que la forma fosforilada del cofactor, NAD(P)H , intervienen en reacciones de transferencia electrónica en rutas de biosíntesis. Las dos formas de cofactor participan en un amplio rango de reacciones redox selectivas, lo cual constituye su poder como estrategia biocatalítica en oxidaciones específicas y reducciones selectivas (Chenault et al., 1988). En los dos cofactores, la transferencia electrónica (proceso redox) implica solamente a la nicotinamida. La reducción enzimática del NAD(P)^+ dirige el ataque del hidruro al C4 del anillo de piridina y forma exclusivamente el 1,4-dihidropiridina, que es la única forma enzimáticamente activa del NAD(P)H . Este requerimiento de reducción 1,4 específica de la piridina limita la mayor parte de las estrategias de regeneración del cofactor a gran escala, otorgando a la ruta enzimática de regeneración notables ventajas sobre el resto en cuanto a selectividad y eficiencia de la regeneración. La adenosina y los pirofosfatos intervienen en el reconocimiento y anclaje del cofactor al centro activo de la enzima. El 2'fosfato de la adenosina de NADPH es la única diferencia entre la forma fosforilada y no fosforilada del cofactor. Esto permite e implica la discriminación biológica y determina la diferencia en cuanto a la dependencia de las enzimas por una u otra forma.

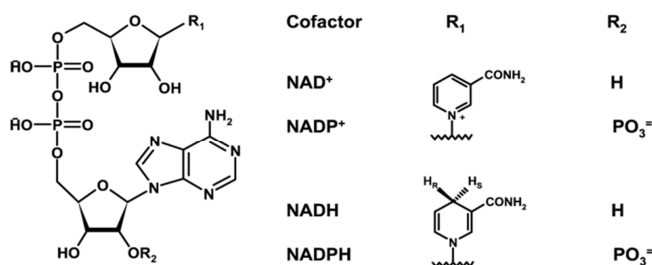


Figura 1. 3. Estructura de los cofactores de nicotinamida.

Las enzimas que utilizan cofactores de flavina (FAD o FMN) son flavoproteínas, como las NADH oxidasas, que necesitan de la presencia de estos cofactores para poder mostrar su actividad.

Cofactores tipo FAD/FMN. La flavina adenina mononucleótido (FMN), o riboflavina-5'-fosfato, es un derivado de la riboflavina (vitamina B2) (**Figura 1. 4**) que actúa como coenzima de diversas

oxidorreductasas. Durante el ciclo catalítico se produce la interconversión reversible (**Figura 1. 5**) entre la forma oxidada (FMN), semiquinona (FMNH[•]) y reducida (FMNH₂) de la coenzima. El FMN es un agente oxidante más fuerte que el NAD⁺ y es particularmente útil ya que puede transferir uno o dos electrones. Es la principal forma en que se halla la riboflavina en las células y tejidos.

La flavina adenina dinucleótido (FAD) es una molécula compuesta por una unidad de riboflavina unida a un grupo fosfato de una adenosina difosfato. Bioquímicamente es un coenzima que interviene como dador o aceptor de electrones y protones en reacciones metabólicas redox, su estado oxidado (FAD) se reduce a FADH₂ al aceptar dos átomos de hidrógeno (cada uno formado por un electrón y un protón).

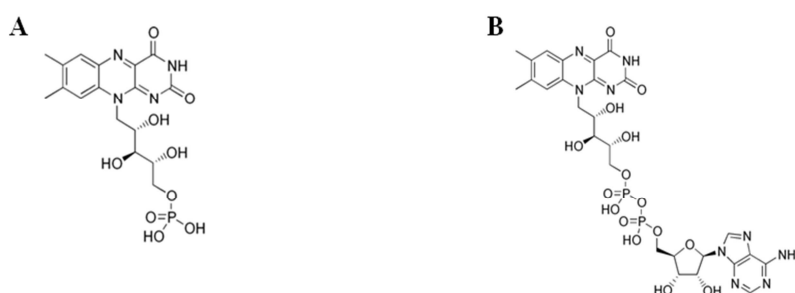


Figura 1. 4. Estructura del FMN (A) y FAD (B).

La interconversión FAD a FADH₂ o FMN a FMNH₂ se produce según la siguiente reacción:

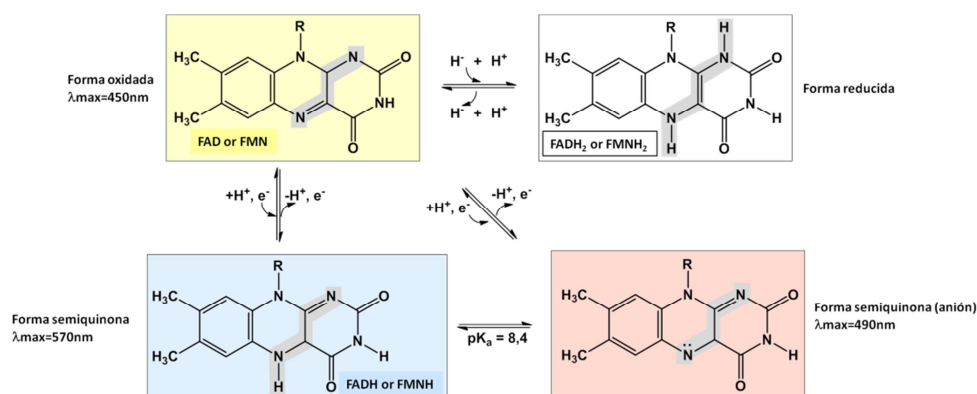


Figura 1. 5. Diferentes estados del FAD y FMN.

Por tanto, al reducirse capta dos protones y dos electrones, lo que lo capacita para intervenir como dador de energía y/o poder reductor en el metabolismo.

1. 6. 1. Estabilidad de los cofactores redox.

Antes de enfrentarse al problema de la necesidad de regenerar el cofactor hay que tener en cuenta la estabilidad del mismo. Este, es un punto importante ya que podría determinar las condiciones de reacción y la estrategia a seguir en el diseño del sistema de regeneración. NAD(P)H y NAD(P)⁺ son

relativamente inestables *in vitro* en disoluciones acuosas (Leonida, 2001). La forma reducida es más estable en disoluciones básicas, mientras que la oxidada es más estable a pH ácido (Lowry et al., 1961; Wong and Whitesides, 1981). El NAD(P)H se descompone en medio ácido mediante epimerización, hidratación y ciclación, mediante un mecanismo de catálisis ácida que no depende linealmente de la acidez (Hentall et al., 2001; Oppenheimer and Kaplan, 1974). En este sentido el NAD(P)H es menos estable que el NAD(P)⁺. El NAD(P)⁺ se descompone mediante un mecanismo de catálisis básica, por adición nucleofílica en el C4 del anillo de nicotinamida o mediante un ataque hidrolítico del enlace ribosa-nicotinamida (Johnson and Smith, 1977). La forma oxidada es más estable a pH moderadamente ácido, pero a pH 2 comienza a sufrir hidrólisis (Lowry et al., 1961). Mientras que el FAD y el FMN son inestables en disoluciones alcalinas siendo más estables a pH 6 (Mack and Grill, 2006). Por tanto, el pH, temperatura y la composición del medio de reacción deben ser considerados porque puede influir de manera importante en la estabilidad de las diferentes formas del cofactor.

1. 7. REGENERACIÓN DEL COFACTOR REDOX.

1. 7. 1. Ventajas.

El uso de DHs como biocatalizadores que requieren cofactor para llevar a cabo su función, exige la adición de los propios cofactores como sustratos o el diseño de un sistema de regeneración *in situ* del mismo, de tal forma que con una adición minoritaria de cofactor al reactor, el sistema funcione en la dirección deseada, de tal modo que siempre se encuentre disponible en la forma catalíticamente activa de la reacción objetivo. Desde el punto de vista termodinámico, cinético y de coste (véase **Tabla 1. 2**) es necesario el uso, diseño y desarrollo de un sistema eficiente y económico de regeneración *in situ* del cofactor (Leonida, 2001; Van Der Donk and Zhao, 2003; Wandrey, 2004; Wichmann and Vasic-Racki, 2005; Zhao and van der Donk, 2003). Por tanto, la regeneración permite utilizar cantidades minoritarias del mismo, simplificando el medio de reacción, la recuperación del producto final, el escalado y por tanto facilitando el uso de las DHs a escala técnica y a escala industrial.

Cofactor	€/gramo
NADH ⁽¹⁾	33
NAD ⁺⁽¹⁾	18,5
NADPH ⁽¹⁾	357,5
NADP ⁺⁽¹⁾	82
FAD ⁽²⁾	280
FMN ⁽²⁾	5,4

Tabla 1. 2. Coste del cofactor (precios año 2011).

(1) Gerbu Biotechnik GmbH. (2) Sigma Aldrich Co.

1. 7. 2. Requerimientos del sistema de regeneración. Tipos de regeneración.

Un sistema de regeneración de cofactor ideal debería seguir los siguientes criterios (Chenault et al., 1988; Leonida, 2001; Van Der Donk and Zhao, 2003): (a) ser un sistema sencillo, (b) tener alta disponibilidad de sus componentes (enzimas, cofactores, etc.), (c) debe ser económico y rentable (viable), (d) de fácil manipulación, (e) poseer una alta estabilidad operacional, (f) ser lo más independiente posible de la reacción principal y tener las mínimas interferencias con la reacción principal, (g) ser absolutamente compatible (así los agentes auxiliares de regeneración y subproductos no interfieran en la purificación del producto objeto de la reacción), (h) poseer una alta selectividad y un alto rendimiento de la reacción de regeneración de la coenzima para el mantenimiento funcional de la coenzima estable, (i) ser una etapa favorable tanto cinética como termodinámicamente y (j) poder controlar eficientemente las variables que determinan la regeneración.

La cuantificación de la eficacia de la regeneración se realiza mediante el número de regeneración TTN (total turnover number o número total de recambio), que se define como el número de moles de producto obtenido por mol de cofactor usado durante un curso completo de reacción. Otro parámetro utilizado para cuantificar la eficacia de la regeneración es la frecuencia de recambio (TOF) se define como el número de moléculas convertidas por unidad de tiempo. Lógicamente debe ser lo más alto posible, y representa la capacidad de regeneración del sistema. Se considera que un TTN de entre 10^2 - 10^4 puede ser suficiente para hacer un proceso económicamente viable dependiendo del valor del producto (Monti et al., 2011; Zhao and van der Donk, 2003).

En cuanto a los tipos de regeneración del cofactor (Chenault et al., 1988; Leonida, 2001; Wichmann and Vasic-Racki, 2005) se pueden dividir en los siguientes métodos:

- i. Microbiológicos, mediante el uso de células enteras que contienen tanto la enzima que cataliza la reacción principal como el cofactor regenerable por la propia maquinaria celular. Suele ser un proceso menos costoso que utilizar enzimas aisladas, pero presenta los mismos inconvenientes que se han comentado anteriormente.
- ii. Enzimáticos, donde la principal ventaja es la alta selectividad y especificidad, tanto para el proceso de regeneración como en el proceso de producción. Por el contrario, las enzimas suelen ser caras y en ocasiones inestables.
- iii. Electroquímicos, donde la fuente oxidante y reductora es la corriente eléctrica. Los principales inconvenientes son la incompatibilidad con muchos sistemas bioquímicos, el uso de equipos y procesos complejos, el uso de mediadores redox o enzimas y los bajos TTN obtenidos. Como principales ventajas se encuentran el relativo bajo coste de la electricidad, potencial redox controlado, fácil monitorización del proceso y aislamiento del producto.
- iv. Químicos, donde se utilizan agentes químicos oxidantes y reductores. Suelen ser procesos con altos potenciales redox y generalmente poco costosos, pero suelen ser poco compatibles con sistemas bioquímicos y logran un bajo TTN.

- v. Fotoquímicos, mediante el uso de complejos de rutenio o zinc, sales como azul de metileno, etc. El equipamiento suele ser complejo, la estabilidad del sistema limitada y con una compatibilidad limitada con los sistemas bioquímicos.

1. 7. 3. Regeneración enzimática del cofactor.

1. 7. 3. 1. Generalidades.

La regeneración enzimática es el método más reconocido para la regeneración del cofactor (Chenault et al., 1988; Leonida, 2001; Wichmann and Vasic-Racki, 2005), sobre todo en su forma reducida. El uso de un sistema de dos enzimas acopladas (una enzima principal y una enzima auxiliar) cada una de ellas con un sustrato diferente es el método más utilizado. El sustrato auxiliar debe tener una serie de propiedades: ser lo más inerte posible, ser barato y que la reacción sea irreversible (Berenguer-Murcia and Fernandez-Lafuente, 2010).

En el caso de la regeneración enzimática de la forma reducida del cofactor de nicotinamida, el uso de formiato deshidrogenasa (FDH) es una de las soluciones preferidas para reciclar NAD(P)H (Popov and Lamzin, 1994; Tishkov and Popov, 2004, 2006) ya que cumple con el criterio para la regeneración de NAD(P)H porque: la reacción es irreversible bajo condiciones normales ya que el dióxido de carbono (CO_2) es un gas que se elimina fácilmente; el CO_2 no interfiere en la purificación del producto final; el ácido fórmico es barato e inerte; y esta enzima puede utilizarse en un amplio rango de pH (6-9) (Mesentsev et al., 1997). Aunque, también podrían utilizarse ADHs, glutamato DHs, glucosa y glucosa-6-fosfato DHs, fosfito DHs e hidrogenasas (Weckbecker et al., 2010).

Mientras que para regenerar la forma oxidada del cofactor de nicotinamida es de interés la reacción reversa donde partimos del cofactor reducido. Las enzimas que podrían utilizarse son glutamato DHs, lactato DHs, ADHs y NADH oxidasas (NOXs). En cualquier caso, un método eficiente de regeneración es necesario para esta ruta. Hasta ahora, sólo unos pocos métodos insatisfactorios son conocidos para este propósito, por ejemplo el uso de α -cetoglutarato y glutamato deshidrogenasa, piruvato junto con lactato DH, acetaldehído con ADH de levadura (Geueke et al., 2003). Por tanto, es muy interesante desarrollar sistemas de regeneración de la forma oxidada del cofactor.

1. 7. 3. 2. NADH oxidasas como regeneradoras de NAD(P)^+ .

La familia de estas enzimas está dividida en dos grandes tipos dependiendo de si forman agua o peróxido de hidrógeno como producto de la reacción. Un tipo genera peróxido de hidrógeno transfiriendo 2 electrones desde el NAD(P)H al O_2 (FAD no unido covalentemente) y el otro tipo genera agua transfiriendo 4 electrones desde el NAD(P)H al O_2 (FAD unido covalentemente a la enzima) con la oxidación del NADH (Jiang and Bommarius, 2004).

Se han purificado NOXs de diferentes microorganismos pero se ha estudiado muy poco su aplicación en la regeneración de NAD(P)^+ . Algunas de ellas son productoras de peróxido de hidrógeno

como (*T. thermophilus*, *Amphibacillus xylans*, *Salmonella typhimurium*, *Thermococcus kodakarensis*) y otras productoras de agua (*Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus brevis*) (Geueke et al., 2003; Riebel et al., 2003; Wu et al., 2012). Como las NOXs homólogas de mesófilo producen agua y no peróxido, se ha propuesto que la producción de peróxido de hidrógeno es una característica de termófilos (Kengen et al., 2003). El uso de este tipo de enzimas regeneradoras es importante para la aplicación de DHs dependientes de NAD(P)⁺, por ejemplo, para convertir hidroxiácidos, aminoácidos o alcoholes en sus correspondientes compuestos ceto; oxidaciones enzimáticas enantioselectivas de alcoholes secundarios racémicos (**Figura 1. 6**); y preparación de enantiómeros *D*-aminoácidos con *L*-aminoácidos DH.

Cuando es necesario adicionar FAD o FMN al medio de reacción para que la NOX regeneradora exprese su actividad, la presencia de oxígeno molecular en el medio oxida de nuevo rápidamente la forma reducida del FMN, de este modo con el O₂ del medio de reacción se regenera de forma no enzimática el FMN (Inouye, 1994).

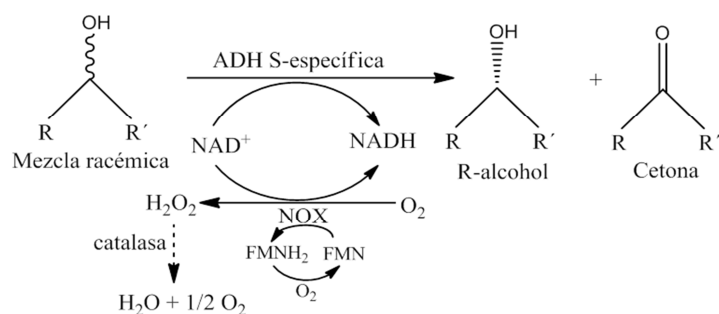


Figura 1. 6. Resolución de una mezcla racémica de alcoholes secundarios utilizando una ADH S-específica y una NOX. Una ADH S-específica oxida selectivamente el S-alcohol presente en la mezcla racémica, de este modo, sólo quedará como productos el R-alcohol más la cetona. Una catalasa se encargará de eliminar el H₂O₂ formado por la NOX.

1. 8. PURIFICACIÓN DE ENZIMAS DE MICROORGANISMOS TERMÓFILOS Y MESÓFILOS.

Es muy importante, sobre todo, en la industria farmacéutica contar con biocatalizadores compuestos únicamente por la enzima de interés. Este hecho, permite obtener un biocatalizador con una actividad catalítica máxima, además de evitar reacciones colaterales indeseadas debido a las actividades de otras enzimas que pudieran estar presentes en el catalizador. Sin embargo, los protocolos convencionales de purificación suelen ser procesos de varias etapas, lo que consume demasiado tiempo y aumenta los costes de la purificación, no suelen ser escalables a nivel industrial y no siempre ofrecen altos rendimientos, por lo que muy pocas enzimas puras tienen un coste final adecuado a su utilización industrial a pesar de las ventajas anteriormente descritas.

1. 8. 1. Purificación de proteínas termoestables mediante tratamiento térmico.

La purificación de enzimas termoestables presenta una complejidad adicional debido a que este tipo de enzimas, por lo general, se encuentran en cantidades minoritarias dentro de la célula lo que, sumado a su crecimiento lento, provocaría que el proceso fuera de alto coste y bajos rendimientos. Sin embargo, los avances en técnicas de ingeniería genética han permitido que estas enzimas puedan ser expresadas en organismos mesófilos; por lo que hoy en día, se pueden obtener grandes cantidades de enzimas recombinantes de termófilos susceptibles de ser aplicadas como catalizadores industriales (Coolbear et al., 1992; Radianingtyas and Wright, 2003). Este hecho ha simplificado enormemente el proceso de purificación de este tipo de proteínas, debido a que con un simple tratamiento térmico del extracto crudo del microorganismo mesófilo, que contiene la proteína termoestable de interés, se promueve la desnaturalización y precipitación de muchas de las proteínas mesófilas presentes en la preparación, mientras que las enzimas del termófilo se mantienen inalteradas (Poltorak et al., 1998). Este es, por tanto, un método de purificación muy eficiente, sencillo y de bajo coste, que podría ser muy útil para purificar enzimas industriales. Además, este protocolo puede ser fácilmente acoplado a otros sistemas de purificación más complejos, cuando el aislamiento total de la enzima es imprescindible.

1. 8. 2. Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Las técnicas de cromatografía de afinidad tienen un especial interés ya que, en principio, podrían permitir la purificación total de la proteína deseada en un solo paso. La cromatografía de afinidad por inmovilización a quelatos metálicos (IMAC) se basa fundamentalmente en una adsorción física de la proteína promovida por la interacción entre determinados residuos aminoacídicos de la superficie proteica (Cys, His o Tyr), y los metales catiónicos de transición que se encuentran formando quelatos con ligandos policarboxílicos unidos al soporte. Por tanto, la fuerza de adsorción de las proteínas dependerá del número y distribución de residuos aminoacídicos capaces de interactuar con el metal. De modo que, ya sea por adsorción selectiva, o por desorción controlada (con concentraciones crecientes de un agente competitivo o mediante un gradiente de pH), podrán separarse selectivamente las proteínas retenidas con diferente grado de afinidad al soporte (Armisen et al., 1999, Porath, 1975, 1992). Por otra parte, la fuerza de adsorción también dependerá del tipo de soporte utilizado para la cromatografía. Por lo que, variando la densidad de ligandos, la longitud del brazo espaciador o el catión empleado, se podrán optimizar tanto la adsorción como la desorción selectiva de estas proteínas, permitiendo además el diseño a medida de diferentes protocolos de purificación.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han utilizado protocolos de purificación sencillos y económicos para purificar las enzimas. Se han combinando métodos físicos (choque térmico) y químicos (cromatografía de afinidad y de intercambio iónico), los cuales tienen un especial interés, ya que estas técnicas en su conjunto, podrían permitir obtener las enzimas de interés con alto grado de pureza en tan sólo dos pasos.

1. 9. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

Como se ha comentado en apartados anteriores, la biocatálisis participa plenamente en el concepto de química verde y cuyo impacto sobre la sostenibilidad está actualmente establecido fuera de toda duda. El diseño de métodos efectivos de inmovilización representa una poderosa herramienta para solucionar los dos principales problemas presentes en el uso de enzimas a nivel industrial (Cao et al., 2003; Hartmeier, 1985; Klibanov, 1979; Mateo et al., 2006, 2007a; Sheldon, 2007b):

- (i) la solubilidad de las enzimas dificultan su separación del medio de reacción y su re-utilización en posteriores ciclos de reacción. La utilización de enzimas inmovilizadas (catalizadores heterogéneos) en los sistemas de ultrafiltración usados habitualmente aporta ventajas adicionales de carácter técnico.
- (ii) la baja estabilidad en condiciones de reacción de las enzimas favorece la inactivación del catalizador a lo largo de la reacción. Además esta inactivación es irreversible, previo paso por un estado de desnaturalización reversible.

Por tanto, en esencia, la inmovilización de enzimas permite una fácil separación y reutilización del biocatalizador, hace que la recuperación del producto sea más fácil y a menudo mejora la resistencia a la inactivación de enzimas frente a los diferentes agentes desnaturalizantes (incluyendo pH extremo o altas temperaturas, la presencia de disolventes orgánicos, inhibidores, etc.).

Para solucionar estos dos problemas se han desarrollado diferentes metodologías para estabilizar las enzimas en preparaciones insolubles. Los protocolos de inmovilización de enzimas descritos en la bibliografía se pueden clasificar en tres grupos principales (Cao et al., 2003; Klibanov, 1979; Mateo et al., 2007a; Sheldon, 2007b):

- (i) enzima unida a un soporte prefabricado (mediante unión covalente o no covalente al soporte).
- (ii) enzima atrapada o encapsulada, donde se forma una red polimérica tridimensional en presencia de la enzima.
- (iii) entrecruzamiento con reactivos bifuncionales (por ejemplo, entrecruzado cristales de enzimas (CLECs) y agregados (CLEAs).

Se pueden distinguir dos formas de inmovilización de proteínas en soportes sólidos porosos: reversible o irreversible. En el primer caso, la enzima puede ser desorbida del soporte recuperando el soporte una vez se haya inactivado la enzima; por el contrario, en el segundo caso, la enzima está unida de forma irreversible por lo que cuando la enzima esté inactiva, se ha de eliminar todo el biocatalizador, enzima y soporte (Mateo et al., 2007a). Sin embargo, con la inmovilización reversible, generalmente, no se pueden alcanzar grandes factores de estabilización debido a que no son capaces de rigidificar la estructura terciaria, salvo para en algunos casos de enzimas multiméricas (Fernandez-Lafuente, 2009).

Por otro lado, la selección del soporte adecuado para la inmovilización es esencial. En la actualidad, existe una amplia variedad de soportes para la inmovilización de enzimas, lo que permite a los investigadores elegir específicamente una serie de características diferentes a la carta en función de la enzima y la aplicación en cuestión (por ejemplo, tamaño de partícula, funcionalidad química, longitud del

brazo espaciador, porosidad, equilibrio hidrófilo-lipófilo del microambiente que rodea la enzima, etc). La **Tabla 1. 3** resume algunos de los diferentes tipos de materiales que han sido investigados como soportes de enzimas, incluyendo las estrategias desarrolladas para la inmovilización de la enzima. La resistencia mecánica, química y estabilidad física del soporte, la carga máxima de la enzima, la pérdida de la enzima o el costo final de fabricación son otras propiedades que deben ser consideradas para la aplicación de biocatalizadores inmovilizados en un entorno industrial específico.

Además de su aplicación como biocatalizadores heterogéneos reutilizables, la inmovilización de enzimas es una plataforma adecuada para desarrollar dispositivos nanotecnológicos estables para aplicaciones analíticas, aplicaciones energéticas y biomedicina (por ejemplo, biosensores, biocombustibles), así como herramientas para la química de proteínas en fase sólida o microdispositivos para la liberación controlada de drogas (Torres-Salas et al., 2011).

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado como soporte base agarosa BCL (beads crosslinked). Partiendo de la matriz agarosa BCL se han utilizado diferentes estrategias de inmovilización tanto reversibles como irreversibles, bien por unión covalente directa entre la proteína y el soporte (Guisán, 1988; Mateo et al., 2006, 2007a, 2007b, 2007c), bien por inmovilización reversible (Fernandez-Lafuente et al., 1993; Fuentes et al., 2004a, 2004b; Mateo et al., 2000) y posterior entrecruzamiento (Betancor et al., 2003; Fernandez-Lafuente, 2009) a través de diferentes químicas de unión entre el enzima y el soporte. En el caso concreto de las DHs, la mayor parte de ellas son enzimas multiméricas, por lo que una inmovilización que involucre todas las subunidades estabilizaría la estructura cuaternaria, protegiendo frente a la inactivación en condiciones que promuevan una disociación de subunidades.

Tipo de material	Ejemplos	Método de inmovilización
Soportes inorgánicos		
Alumina, zirconia	Aminoalquilsilano-alumina	Adsorción, covalente
Silica	Silica de poro controlado, silica hexadecil	Adsorción, covalente
Oxidos de hierro	Nanopartículas magnéticas	Adsorción, covalente
Silica mesoporosa	SBA-15, FDU-12	Adsorción, covalente, encapsulación
Zeolitas	Zeolita Na Y	Adsorción
Polímeros orgánicos		
Poliacrilamida	Eupergit C	Covalente
Polimetacrilato	Sepabeads, Dilbeads	Covalente
Poli(estireno-codivinilbenzeno)	Amberlita XAD-7, Duolita A-7, Dowex SBR-P	Adsorción
Poli(propileno)	Accurel EP-100	Adsorción
Hidrogeles		
Poli(vinil alcohol)	Lentikats	Atrapamiento
Silica sol-gel	Xerogeles, Aerogeles	Atrapamiento
Biopolímeros		
Polisacáridos modificados	Agarosa glioxil, DEAE Sepharose, CM-Sepharose, Octil-Sepharose, BrCN-Sepharose, DEAE-celulosa, etc.	Covalente, adsorción iónica, adsorción hidrofóbica

Tabla 1. 3. Materiales utilizados como soportes para inmovilizar enzimas y métodos de unión.

1. 9. 1. Métodos irreversibles: Inmovilización mediante enlace covalente.

Este método de inmovilización supone la unión irreversible entre la enzima y el soporte. Los enlaces que se forman son fuertes y estables, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción. La unión covalente puede establecerse a través de grupos funcionales que están presentes en la superficie del soporte activado y los grupos -NH_2 (Lys), -SH (Cys), -OH (Tyr y Ser), -COOH (Asp y Glu) que están presentes en la superficie de la proteína. De este modo, se logra que la enzima se una irreversiblemente al soporte a través de enlaces tipo amida, tio-éter, éter, enlaces carbamatos, etc., (Srere and Uyeda, 1976). Para obtener un buen rendimiento de inmovilización, es importante que los aminoácidos esenciales para la catálisis no estén involucrados en la unión covalente al soporte.

1. 9. 1. 1. Unión covalente sobre soportes activados con grupos bromuro de cianógeno.

La inmovilización de enzimas sobre un soporte agarosa activado con grupos bromuro de cianógeno (BrCN) (**Figura 1. 7**) se realiza a baja temperatura y pH neutro, por lo que la interacción entre la enzima y el soporte procede a través del grupo amino más reactivo de la proteína (posiblemente el amino terminal) de modo que casi no existe rigidificación de la estructura de la enzima (Mateo et al., 2005).

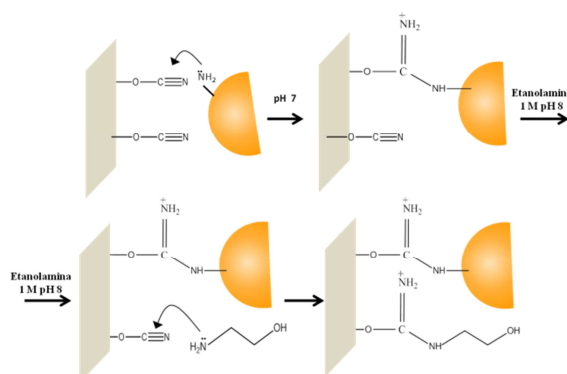


Figura 1. 7. Inmovilización covalente unipuntual sobre soportes BrCN-Sepharose®.

1. 9. 1. 2. Unión covalente multipuntual sobre soportes activados con grupos glioxil.

La inmovilización por unión covalente multipuntual en soportes altamente funcionalizados, a través de brazos espaciadores cortos e involucrando a muchos residuos de la superficie de la enzima, promueve una rigidificación de la estructura terciaria de la proteína (Klibanov, 1979, 1983; Mateo et al., 2007a; Pedroche et al., 2007). De tal forma que las posiciones relativas de los residuos implicados en la unión covalente multipuntual permanecen inalterados durante los cambios conformacionales inducidos por agentes distorsionantes (altas temperaturas, solventes orgánicos, valores extremos de pH, etc.). Esto reduce los cambios conformacionales que implican la inactivación de la enzima permitiendo aumentar su estabilidad.

El soporte agarosa glioxil (Ag-Glx) presenta unas características ideales para lograr esta unión irreversible con la enzima ya que presenta una monocapa de grupos aldehídos totalmente expuestos al medio con los que reaccionan fácilmente los aminos primarios no ionizados de la enzima. Estos grupos tienen además un brazo espaciador muy corto, de forma que parte de la superficie de la enzima queda muy próxima a la superficie del soporte lo cual confiere a la enzima inmovilizada mayor rigidez y una mayor estabilidad.

Por otro lado, el control sobre el grado de activación del soporte permite alcanzar elevadas densidades de grupos aldehídos por superficie de soporte, permitiendo conseguir un grado de interacción enzima-soporte bastante intenso. Este sistema, sin embargo, presenta tres desventajas: (i) la necesidad de inmovilizar a un pH muy básico (pH 10), algunas enzimas son poco estables en estas condiciones; (ii) el uso de borohidruro en la reducción del enlace tipo base de Schiff, puede representar un problema cuando se piensa en una producción a nivel industrial; (iii) este sistema estrictamente inmoviliza proteínas a través de la zona más rica en Lys y aunque estos residuos son muy abundantes en la superficie de la mayoría de las proteínas, algunas proteínas presentan pocos de estos residuos en su superficie, dificultando su estabilización en este tipo de soportes. A pesar de ello un gran número de enzimas han sido inmovilizadas a través de esta estrategia y han logrado alcanzar altos factores de estabilización con respecto a la enzima soluble (Mateo et al., 2006).

La inmovilización sobre Ag-Glx tiene lugar a través de la zona de la superficie de la enzima con mayor densidad de grupos amino primario y no solo a través del grupo amino más reactivo como ocurre en la mayoría de las otras técnicas de inmovilización covalente. En un primer paso (**Figura 1. 8**), se produce la formación de enlaces tipo base de Schiff (grupos imino) entre los ϵ -NH₂ de las Lys y los grupos aldehídos del soporte. Las Lys son normalmente aminoácidos abundantes en la superficie proteica, expuestas al medio y, cuando están desprotonadas, son muy reactivas como nucleófilos por lo que es necesario realizar la reacción a un pH que esté por encima del pK_a de los grupos ϵ -NH₂ (pH 9.2). En esta primera interacción entre la enzima y el soporte se producen, al menos, dos uniones. Después de la incubación, donde la enzima se autoorienta sobre el soporte a través de su zona más rica en grupos amino reactivos, se produce la interacción múltiple, pero reversible (Guisán, 1988; Mateo et al., 2006). En un segundo paso, se reducen las bases de Schiff a enlaces amino secundario con borohidruro de sodio. Esta reducción permite conseguir una unión irreversible entre la enzima y el soporte, y además, transformar todos los grupos aldehído remanentes en grupos hidroxilo dando lugar a una matriz inerte e hidrofílica, lo cual es importante para evitar reacciones indeseadas que desestabilicen la proteína, llegando a inactivarla.

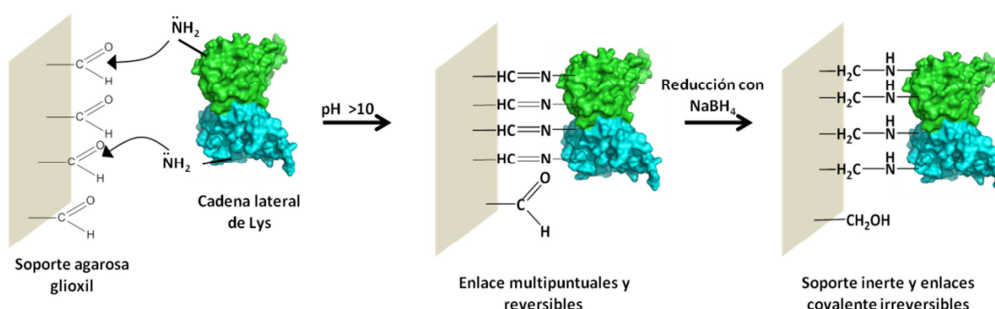


Figura 1. 8. Inmovilización covalente multipuntual sobre glioxil-agarosa.

1. 9. 1. 3. Inmovilización sobre soportes heterofuncionales.

La inmovilización de enzimas por unión covalente multipuntual es uno de las metodologías más interesantes para inmovilizar y estabilizar enzimas simultáneamente. Es muy interesante diseñar nuevos protocolos de inmovilización en los cuales la inmovilización covalente multipuntual tenga lugar a través de las regiones de la enzima más sensitivas a los agentes desnaturalizantes. Además, su rigidificación podría dar lugar a catalizadores más estables incluso cuando el número de enlaces covalentes es menor que el obtenido a través de la región más rica en residuos Lys. Por tanto, la rigidificación de las enzimas a través de esas regiones podría promover una alta recuperación de actividad después de la inmovilización y una mejora de la selectividad de las enzimas inmovilizadas (Mateo et al., 2005; Mateo et al., 2006).

Recientemente, se han diseñado nuevos soportes heterofuncionales (soportes agarosa funcionalizados con dos grupos reactivos distintos) que están constituidos por una alta concentración de grupos que son capaces de adsorber proteínas a pH neutro como también por una alta concentración de grupos glioxil que no son capaces, generalmente, de inmovilizar enzimas covalentemente a pH neutro (Mateo et al., 2007b; Mateo et al., 2010). El soporte agarosa puede modificarse con reactivos de distinta naturaleza, que se encargarán de la adsorción de la proteína a pH neutro, como: trietilamina que da lugar a soportes amino glioxil (Ag-A-Glx), ácido iminodiacético da lugar a soportes carboxilo glioxil (Ag-IDA-Glx), quelato metálico da lugar a soportes quelato glioxil (Ag-IDA-Me²⁺-Glx), ácido *p*-aminofenil borónico que da lugar a soportes boronato glioxil (Ag-B-Glx), etc., que podrían dar lugar a diferentes orientaciones de la enzima sobre el soporte (véase **Tabla 1. 4**).

Soporte agarosa	Posible orientación de la enzima
Monofuncional glioxil (Ag-Glx)	Región con mayor cantidad de residuos Lys
Amino glioxil (Ag-A-Glx)	Región con mayor carga neta negativa
Carboxilo glioxil (Ag-IDA-Glx)	Región con mayor carga neta positiva
Quelato glioxil (Ag-IDA-Me ²⁺ -Glx)	Región con mayor cantidad de residuos His
Boronato glioxil (Ag-B-Glx)	Región con mayor afinidad por boronatos (por ej. algunos enlaces peptídicos específicos)
Disulfuro glioxil (Ag-S-Glx)	Región con residuos Cys

Tabla 1. 4. Diferentes posibles orientaciones de las enzimas inmovilizadas en soportes agarosa heterofuncionales.

El protocolo de inmovilización en soportes heterofuncionales consiste en dos pasos (**Figura 1. 9**): (i) las enzimas son adsorbidas al soporte a pH neutro a través de la región complementaria a los grupos introducidos en el soporte capaces de adsorber la proteína a pH neutro; (ii) la enzima adsorbida al soporte se incuba en condiciones alcalinas para promover la formación de enlaces covalentes multipuntuales entre los grupos glioxil del soporte y los grupos amino primarios cercanos a la región por donde se ha adsorbido la proteína.

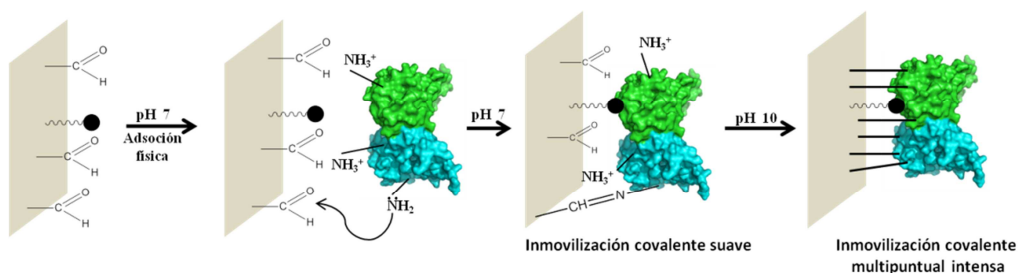


Figura 1. 9. Mecanismo de inmovilización-estabilización utilizando soportes agarosa glioxil heterofuncionales. El ligando introducido encargado de la adsorción de la proteína a pH 7 se representa con el símbolo: $\text{---}\bullet$

1. 9. 2. Métodos reversibles: Inmovilización por intercambio iónico.

Las fuerzas que intervienen en la adsorción iónica de la proteína al soporte son, en su mayoría, de tipo electrostático y aunque estas fuerzas son débiles, si abundan, son suficientes para generar una unión estable entre la enzima y el soporte. Los protocolos de inmovilización son generalmente simples; basta poner en contacto la enzima con el soporte bajo condiciones suaves de reacción (baja fuerza iónica). Estos métodos de inmovilización reversible serían útiles en los procesos industriales en los que el coste del soporte representa un valor importante dentro del coste global del biocatalizador.

Tradicionalmente se han utilizado estos métodos para procesos de purificación de enzimas y no tanto para inmovilización, debido a la dificultad que conlleva mantener la proteína adsorbida sobre el soporte en las condiciones de reacción deseadas (Chen et al., 2003; Lyddiatt, 2002; Rao, 2001). Variaciones de pH, presencia de sustratos o productos ionizables, así como el empleo de altas temperaturas para solubilizar reactivos pueden acelerar la desorción de la enzima (Kennedy et al., 1990; Rosevear, 1984; Royer, 1980). Por tanto, se han desarrollado matrices flexibles de gran superficie y con una alta densidad de residuos iónicos que interaccionan con la superficie enzimática, para extender el uso de enzimas adsorbidas a soportes iónicos como biocatalizadores de uso industrial. Esto permite una unión más fuerte que la alcanzada con soportes convencionales de adsorción iónica tipo agarosa dietilaminoetil (DEAE), agarosa monoaminoetil-N-aminoetil (MANAE), etc.

El recubrimiento de las superficies de los soportes porosos con polímeros iónicos flexibles que contienen una alta densidad de grupos cargados para el intercambio iónico, permite inmovilizar enzimas de forma reversible y fuerte sin que la estructura tridimensional de la enzima se distorsione (Fuentes et al., 2004b; Mateo et al., 2000; Torres et al., 2006). Sin embargo, una vez que la enzima se inactive o el biocatalizador no sea rentable aún podría someterse a condiciones drásticas (1 M de NaOH o NaCl) para recuperar el soporte polimérico, libre de la enzima inactiva (Baumeister et al., 2003; Iberer et al., 2001; Pessela et al., 2003). Además se ha descrito, que es posible adsorber proteínas en soportes recubiertos con estos polímeros que no pueden ser adsorbidas sobre soportes convencionales (Kumar et al., 2000; Torres et al., 2006). La inmovilización de proteínas sobre soportes recubiertos de polímeros puede tener ventajas adicionales como prevenir la disociación de subunidades en enzimas multiméricas (Arica and Bayramoğlu, 2006; Fernandez-Lafuente, 2009; Mateo et al., 2000; Torres et al., 2004) o generar microambientes hidrofílicos que estabilicen la proteína frente a la presencia de disolventes orgánicos

(Fernandez-Lafuente et al., 1999; Fuentes et al., 2004b). La agarosa polietilenimina (Ag-PEI) y agarosa dextrano-sulfato (Ag-DS) son ejemplos de soportes de agarosa recubiertos por polímeros iónicos.

1. 10. ESTABILIZACIÓN DE ENZIMAS MULTIMÉRICAS.

Además de la inactivación por pérdida de la estructura terciaria, por modificación química y por pérdida de cofactores o coenzimas, el principal mecanismo de inactivación en el caso de enzimas multiméricas suele ser la disociación de las subunidades bajo determinadas condiciones de operación (Pilipenko et al., 2007; Poltorak et al., 1998). La inmovilización de proteínas no siempre es suficiente para estabilizar totalmente la estructura cuaternaria de las enzimas multiméricas. En algunos casos las subunidades no están en el mismo plano (por ejemplo, enzimas tetraméricas con configuración tetraédrica), haciendo imposible estabilizar la enzima solo vía inmovilización. En estos casos las subunidades de la enzima podrían liberarse al medio de reacción y se desactivarían fácilmente (**Figura 1. 10A**).

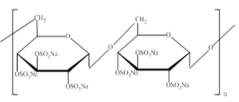
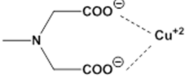

Tipo de inmovilización/Soporte	Grupo funcional	Posible orientación de la enzima
<i>Inmovilización reversible por intercambio iónico (intercambiadores aniónicos)</i>		
DEAE Sepharose® (dietilaminoetil)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}-(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	Región con mayor carga neta negativa
Q-Sepharose®	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Región con mayor carga neta negativa
Ag-MANAE (Monoamino-N-aminoetil)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	Región con mayor carga neta negativa
Ag-PEI (polietilenimina)	$\begin{array}{c} \text{HN}-(\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N})_x-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_y \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \end{array}$	Región con mayor carga neta negativa
<i>Inmovilización reversible por intercambio iónico (intercambiadores catiónicos)</i>		
Sulfopropil Sepharose®	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$	Región con mayor carga neta positiva
Carboximetil Sepharose®	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Región con mayor carga neta positiva
Ag-DS (dextrano-sulfato)		Región con mayor carga neta positiva
<i>Inmovilización reversible mediante afinidad</i>		
Ag-IDA-Me ²⁺ (Cu ²⁺ y Ni ²⁺)		Región con mayor cantidad de residuos His
<i>Inmovilización covalente (irreversible)</i>		
Ag-Glx (glioxil)		Región con mayor densidad de residuos Lys
BrCN Sepharose® (bromuro de cianógeno)	$-\text{O}-\text{C}\equiv\text{N}$	A través del extremo amino terminal

Tabla 1. 5. Resumen de algunas de las estrategias de inmovilización sobre soportes monofuncionales utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En algunas enzimas, tales como las DHs, es condición necesaria la unión de todas las subunidades entre sí para mantener su actividad catalítica. Por tanto, el diseño de catalizadores de enzimas multiméricas pasa por el conocimiento de estas condiciones y en evitar esta inactivación mediante la estabilización de la estructura cuaternaria.

Se han desarrollado y utilizado varios métodos para estabilizar la estructura cuaternaria de enzimas multiméricas tales como el entrecruzamiento químico (Fernandez-Lafuente et al., 2001; Mateo et al., 2007a), la inmovilización (Mateo et al., 2007a) o la ingeniería de proteínas. Una de las técnicas de estabilización de enzimas multiméricas más utilizadas es la inmovilización y posterior entrecruzamiento con polímeros como dextrano-aldehído (dex-CHO) o polietilenimina (PEI) (**Figura 1. 10B**).

El dex-CHO evita la disociación de las subunidades y modifica la superficie de la proteína con las siguientes ventajas (Guisan et al., 1997): produce un entrecruzamiento general entre grupos reactivos de la superficie de la proteína (entrecruzamiento intersubunidades); estabiliza la enzima mediante restricciones de la movilidad de la superficie de la proteína; incrementa la resistencia al desplegamiento de la enzima y la disociación de subunidades; estabilización de la enzima por enmascaramiento de grupos hidrofóbicos de la superficie de la enzima y estabilización de la enzima porque crea una barrera resistente a agentes químicos (como peróxidos); disolventes orgánicos y reactivos apolares (microambiente artificial alrededor de la superficie de la enzima). Por tanto puede producir cambios muy importantes de las propiedades de la superficie de la proteína (hidrofobicidad, carga, etc).

En definitiva, el conocimiento de los fenómenos de inactivación y de los métodos de inmovilización y estabilización nos permitirían obtener derivados estables operacionalmente en una amplia gama de condiciones.

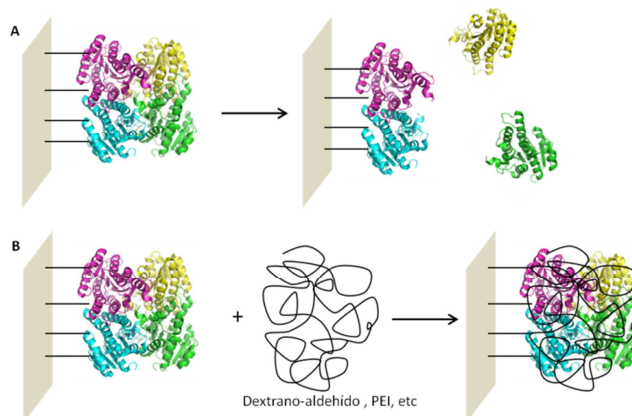


Figura 1. 10. Inmovilización de enzimas multiméricas. (a) Inmovilización por unión covalente multipuntual. (b) Inmovilización por unión covalente multipuntual más recubrimiento con polímeros.

1. 11. REACTIVACIÓN DE BIOCATALIZADORES.

El uso de enzimas en presencia de disolventes orgánicos puede tener interés para diferentes propósitos: como mejorar la solubilidad de los sustratos o productos (Iyer and Ananthanarayan, 2008), para cambiar el equilibrio termodinámico (Cao, 2005; Illanes, 1999), mejorar las propiedades de la enzima (Katchalski-Katzir, 1993; Mozhaev et al., 1987) o incluso para prevenir la contaminación microbiana. Uno de los problemas de los disolventes orgánicos y codisolventes en biotransformaciones es el hecho de que las enzimas se inactivan fácilmente en presencia de altas concentraciones de estos compuestos incluso a pH neutro y bajas temperaturas (Goldberg, 1991; Jungbauer et al., 2004; Rogl et al., 1998). En este sentido, la reactivación de esas enzimas en estos reactores industriales incrementaría la vida media operacional de estos biocatalizadores (Mozhaev et al., 1987). Así, cuando una enzima se inactiva en condiciones químicas inertes (**Figura 1. 11**), sin sufrir una inactivación por pérdida de coenzimas, y donde la estructura cuaternaria ha sido estabilizada, el único mecanismo de inactivación es la distorsión de la estructura terciaria. En estos casos, es posible imaginar que la estructura primaria de la enzima se mantiene intacta y en estas condiciones podría ser factible revertir el proceso de distorsión y recuperar la estructura perfectamente activa de la enzima (Soler et al., 1997).

El uso de enzimas inmovilizadas sobre soportes sólido poroso, debería simplificar y mejorar el desarrollo de estrategias de reactivación ya que: (a) las moléculas de enzima no pueden agregar aunque estén parcial o totalmente desplegadas aunque se encuentren en concentraciones muy altas (Goldberg, 1991); (b) los cambios en las condiciones experimentales (pH, presencia de guanidina, presencia de aditivos, etc.) se pueden realizar muy fácilmente, solo se necesita filtrar y resuspender en diferentes medios a los biocatalizadores que se quieren reactivar; (c) los puntos de unión de la enzima al soporte funcionarían como puntos de referencia, facilitando la reactivación (Mozhaev et al., 1987; Rodrigues et al., 2009a; Soler et al., 1997).

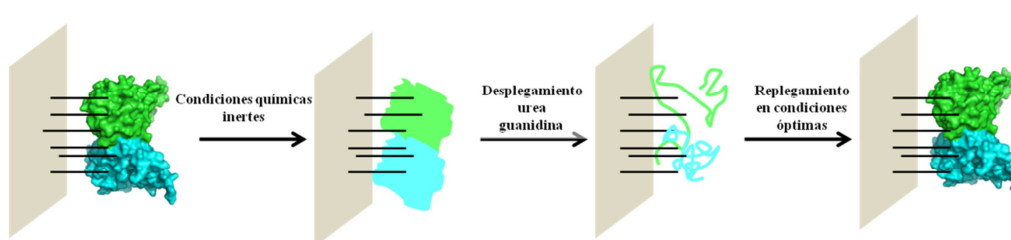


Figura 1. 11. Reactivación de enzimas inmovilizadas inactivadas en condiciones químicas inertes.

Cuando se desea desarrollar estrategias de reactivación, la guanidina podría jugar dos papeles muy importantes: (i) servir como agente distorsionante para promover la inactivación total de la enzima; (b) servir para desplegar estructuras incorrectas con un cierto grado de estabilidad que pudieran haberse formado durante la inactivación por otros agentes distorsionantes y que puedan resultar un impedimento para la adquisición de la estructura activa. Así, ha sido aplicada en la reactivación de enzimas, que debido a su alta sobreexpresión han agregado formando cuerpos de inclusión (Singh and Panda, 2005).

Las enzimas multiméricas son un caso especialmente complejo. Estas enzimas se producen como monómeros individuales que más tarde se ensamblan mediante numerosas interacciones débiles no covalentes (globalmente bastante fuertes). La disociación de subunidades es en muchas ocasiones la principal razón de su inactivación (Fernandez-Lafuente, 2009; Poltorak et al., 1998), por lo que, la reactivación de estas enzimas necesita conseguir el correcto plegamiento de cada monómero y el correcto ensamblaje del multímero. Por tanto, en la reactivación de enzimas multiméricas hay que considerar algunos aspectos: (1) si alguna subunidad no está unida al soporte, en los pasos de lavado del reactor pueden perderse y (2) la proximidad de una subunidad a otra puede producir estructuras incorrectas por interacciones entre cadenas pertenecientes a diferentes subunidades enzimáticas. El primer problema se soluciona si la inmovilización de la enzima involucra a todas las subunidades (Mateo et al., 2007a). Si no es el caso, la enzima se podría entrecruzar con polímeros polifuncionales (Betancor et al., 2003; Fernandez-Lafuente et al., 2001). Mientras que el segundo problema es más complejo, aunque la enzima inmovilizada multipuntualmente al soporte puede reducir la movilidad de sus cadenas polipeptídicas, y eso puede hacer que no se formen interacciones subunidad-subunidad.

1. 12. SISTEMAS MULTIENTZIMÁTICOS. CO-INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

Las reacciones multientzimáticas en cascada están teniendo cada vez más importancia dentro de la biocatálisis. Cuando utilizamos el término cascada biocatalítica nos referimos a cualquier reacción donde dos o más biotransformaciones tienen lugar en un mismo reactor, utilizando al menos un biocatalizador. Este término incluye sistemas multientzimáticos y quimioenzimáticos (Ricca et al., 2011). Las reacciones que tienen lugar en un mismo reactor, en comparación con los sistemas no integrados, tiene indudables ventajas que pueden influir en la eficiencia de un proceso. Se pueden resumir de la siguiente manera: (i) cambio del equilibrio de una reacción reversible, (ii) altos rendimientos, (iii) aumento de la velocidad de reacción, (iv) superación de los efectos de la inhibición, y (v) superación de los problemas de solubilidad. Todos estos hechos tienen un efecto directo sobre diagrama de flujo del proceso, y por lo tanto en la viabilidad del proceso, facilidad de operación y los costes. La mayoría de las cascadas multientzimáticas en biocatálisis han sido desarrolladas para la síntesis de carbohidratos, conversión de azúcares, alcoholes ópticamente activos, aminas, aminoácidos, formación de enlaces C-C, etc., (Ricca et al., 2011).

El desarrollo de sistemas multi-enzimáticos co-inmovilizados se está incrementado en los últimos años debido a las limitaciones económicas y medioambientales de los métodos sintéticos secuenciales o en cascadas convencionales. En un intento de mimetizar los procesos metabólicos que ocurren dentro de una célula viva, la co-inmovilización consiste en inmovilizar un número de biocatalizadores secuenciales o cooperadores en el mismo soporte para mejorar, principalmente, la estabilidad y mejorar la cinética de la reacción. Existen tres razones principales para la utilización de la co-inmovilización de enzimas: para aumentar la eficiencia de las enzimas por la regeneración *in situ* de

cofactores, simplificar un proceso que normalmente se lleva a cabo en varios pasos y/o eliminar subproductos no deseados de la reacción.

El uso de cascadas enzimáticas junto a la co-inmovilización de enzimas requiere la optimización específica del balance de los componentes catalíticos y además es necesario evaluar los distintos métodos de inmovilización, diseñar y preparar los soportes de inmovilización adecuados, como también, analizar la cinética de la reacción y las características de la transferencia de masas para determinar las condiciones óptimas de reacción (Betancor and Luckarift, 2010; Sun et al., 2009). A modo de ejemplo, en la **Figura 1. 12** se puede observar una cascada enzimática donde se combinan oxidorreductasas con regeneración *in situ* del cofactor, en un proceso de desracemización y estereoinversión de alcoholes vía oxidación de uno de los enantiómeros a la correspondiente cetona y una posterior reducción del enantiómero de configuración opuesta. Mediante la combinación de dos ADHs estereocomplementarias en un sólo reactor con regeneración *in situ* del cofactor en ambas enzimas se puede controlar el equilibrio de la oxidación/reducción y por lo tanto sobre el resultado estereoquímico de la reacción.

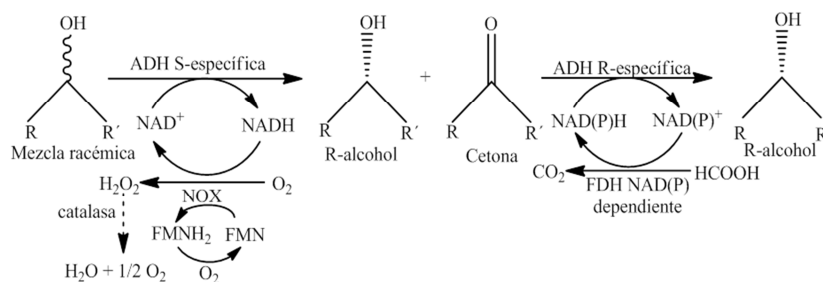


Figura 1. 12. Desracemización y estereoinversión de alcoholes utilizando una cascada enzimática de ADHs.

Por tanto, la coinmovilización proporciona numerosas aplicaciones biotecnológicas, desde biosensores a regeneración de cofactores y la combinación con múltiples biocatalizadores para la síntesis de productos valiosos (Betancor and Luckarift, 2010).



Objetivos

2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el diseño de procesos enzimáticos redox con regeneración *in situ* de cofactores. Estudiamos tanto reducciones asimétricas como oxidaciones y reducciones selectivas. Hacemos un planteamiento multidisciplinar que incluye los siguientes sub-objetivos:

- a) Búsqueda de nuevos genes que codifiquen para enzimas con actividad deshidrogenasa en el genoma de *Thermus thermophilus* cepa HB27.
- b) Expresión de las proteínas seleccionadas en *Escherichia coli*.
- c) Purificación de las enzimas recombinantes mediante un paso principal de tratamiento térmico gracias a la mayor termoestabilidad de dichas enzimas con respecto a las proteínas del hospedador.
- d) Inmovilización muy suave (por ejemplo, unión covalente por un único enlace covalente enzima-soporte) para evaluar las propiedades bioquímicas y biotecnológicas de la enzima nativa con actividad deshidrogenasa en ausencia de artefactos que pudieren enmascarar las propiedades de la enzima soluble.
- e) Inmovilización-estabilización de las enzimas de interés por unión covalente multipuntual. De este modo si la enzima se une al soporte a través de numerosos residuos de su superficie las distancias relativas de estos residuos han de mantenerse inalteradas frente a cualquier distorsión estructural promovida por cualquier agente inactivante.
- f) Desarrollo de estrategias de reactivación de los biocatalizadores inmovilizados después de su inactivación parcial o total.
- g) Diseño de procesos de reducción asimétrica, oxidación regioselectiva ó reducción enantioselectiva, utilizando una deshidrogenasa principal y una deshidrogenasa auxiliar para regenerar los cofactores correspondientes ($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ para oxidaciones y NADH/NADPH para reducciones).
- h) Optimización de los procesos bi-enzimáticos mediante diferentes estrategias de inmovilización de las enzimas con el objetivo de minimizar la cantidad de cofactor soluble necesario para llevar a cabo las reacciones redox:
 - i. inmovilización de cada enzima en un soporte diferente.
 - ii. co-inmovilización de las dos enzimas en el mismo soporte.
 - iii. co-inmovilización de las dos enzimas en el mismo soporte con idéntica distribución de las dos enzimas a lo largo de la estructura porosa del soporte.

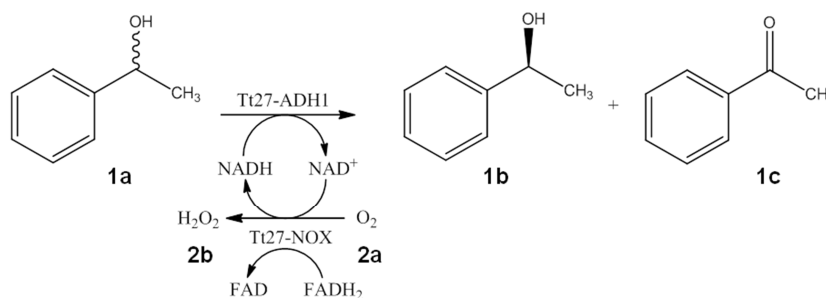
Objetivos

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral hemos trabajado principalmente con las siguientes enzimas:

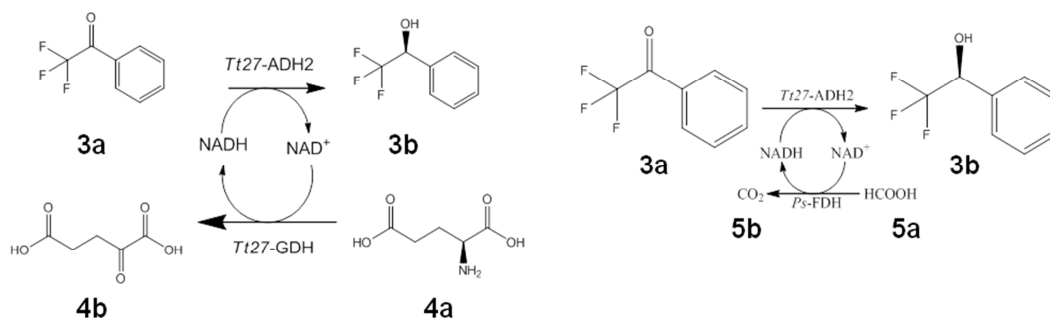
1. Alcohol deshidrogenasa recombinante de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH1).
2. Alcohol deshidrogenasa recombinante de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH2).
3. Glicerol deshidrogenasa recombinante de *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH).
4. Glicerol deshidrogenasa recombinante de *Gluconobacter oxydans* (Cb-GyDH).
5. Seis variantes recombinantes de la NADH oxidasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-NOX).
6. Glutamato deshidrogenasa recombinante de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-GDH). Formiato deshidrogenasas recombinantes de *Pseudomonas* sp., tanto dependiente de NAD^+ como dependiente de NADP^+ (Ps-FDH).

Así, hemos diseñado los siguientes procesos redox donde se han aplicado todos estos biocatalizadores inmovilizados en sus diferentes combinaciones:

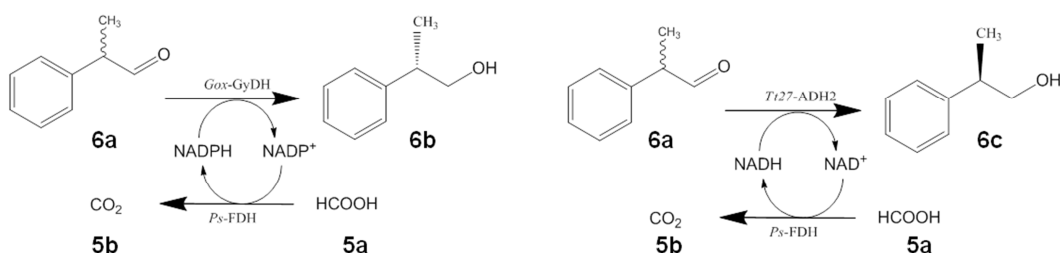
- i. Resolución cinética del (*rac*)-1-feniletanol mediante el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX. A partir de una mezcla racémica de 1-feniletanol (**1a**) la Tt27-ADH1 oxida enantioselectivamente el (*S*)-1-feniletanol a acetofenona (**1c**), quedando el (*R*)-1-feniletanol sin ser oxidado (**1b**). La Tt27-NOX regenera el cofactor reducido mediante el consumo de oxígeno molecular (**2a**) para producir peróxido de hidrógeno (**2b**).



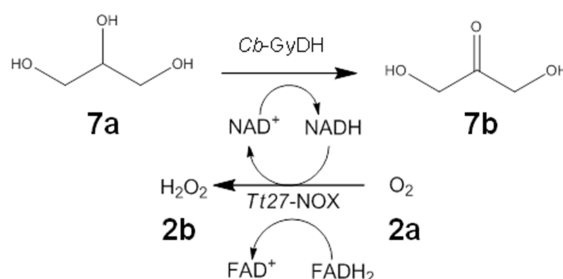
- ii. Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA) catalizada por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH NAD^+ dependiente o Tt27-ADH2/Tt27-GDH. Donde la Tt27-ADH2 reduce asimétricamente la TFA (**3a**) a alcohol (*R*)- α -(trifluorometil)bencílico (**3b**). La Tt27-GDH se encarga de regenerar el cofactor utilizando ácido *L*-glutámico (**4a**) como sustrato y dando lugar a α -cetoglutarato (**4b**). También hemos utilizado como enzima regeneradora de cofactor la Ps-FDH que utiliza como sustrato ácido fórmico (**5a**) y produce CO_2 (**5b**).



- iii. Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal catalizada por el sistema el bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH NAD⁺ dependiente o Gox-GyDH/Ps-FDH NADP⁺ dependiente. Donde se reduce enantioselectivamente el 2-fenilpropanal (**6a**) para dar preferentemente (*S*)-2-fenil-1-propanol (**6b**) en el caso de la Cb-GyDH o (*R*)-2-fenil-1-propanol (**6c**) en caso de la Tt27-ADH2. Como enzima regeneradora de cofactor se ha utilizado la Ps-FDH dependiente de NADP⁺ o dependiente de NAD⁺, según el caso, utilizando ambas como sustrato ácido fórmico (**5a**) y produciendo CO₂ (**5b**).



- iv. Oxidación selectiva de glicerol (**7a**) a dihidroxiacetona (**7b**) catalizada por el sistema bi-enzimático Cb-GyDH/Tt27-NOX. La Tt27-NOX regenera el cofactor mediante el consumo de oxígeno molecular (**2a**) para producir peróxido de hidrógeno (**2b**).



A blue folder icon with a white grid pattern on its top flap, containing the text "Materiales y métodos" in white serif font.

Materiales y métodos

3. MATERIALES.

Proveedor	Enzimas
Donada por el Profesor J. Berenguer (CBMSO, UAM-CSIC)	NADH oxidasa recombinante y nativa de <i>T. thermophilus</i> HB27 (Tt27-NOX) y sus diferentes mutantes recombinantes
	Alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27 (Tt27-ADH1)
	Alcohol deshidrogenasa recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27 (Tt27-ADH2)
	Glutamato deshidrogenasa recombinante de <i>T. thermophilus</i> HB27 (Tt27-GDH)
Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EEUU)	Glicerol deshidrogenasa de <i>Gluconobacter oxydans</i> (Gox-GyDH) Peroxidasa de rábano (HRP)
Codexis (Julich Fine Chemicals) (Redwood city, CA, EEUU)	Formiato deshidrogenasa NAD(P) ⁺ específica de <i>Pseudomonas</i> sp. (Ps-FDH)
Proveedor	Soportes
GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)	BrCN Sepharose [®]
	DEAE Sepharose [®]
	Sulfopropil Sepharose [®]
	Q- Sepharose [®]
	Carboximetil Sepharose [®]
Agarose Bead Technologies (Madrid, España)	Agarosa 4 BCL, 6 BCL y 10 BCL
Proveedor	Cofactores
Codexis (Redwood city, CA, USA) y Gerbu Biotechnik GmbH (Wieblingen, Alemania)	Nicotinamida adenina dinucleótido: forma oxidada (NAD ⁺) y reducida (NADH)
	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato: forma oxidada (NADP ⁺) y forma reducida (NADPH)
Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EEUU)	Flavina adenina mononucleótido (FMN) Flavina adenina dinucleótido (FAD)
Proveedor	Productos Químicos
Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EEUU)	Dextrano de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> de diferentes pesos moleculares (1.5, 6, 70 y 200 KDa)
	Dextrano-sulfato (100 KDa)
	Borohidruro de sodio (NaBH ₄)
	Etilendiamina (EDA)
	2,3 epóxi-propanol (Glicidol)
	Epiclorhidrina
	Trietilamina (TEA)
	Polietilenimina (PEI) de 600-1000 kDa.
	Sulfato de cobre (II)
	Ácido iminodiacético (IDA)
	Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
	Imidazol
	Sulfato de cobre (II) 5*hidratado, cloruro de níquel (II) 6*hidratado
	Ampicilina
	Iso-propil-1-Tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)
	1,4 dioxano, diglime
	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS)
	Fluorescamina isotiocianato y rodamina B isotiocianato

Material es y métodos

Proveedor	Productos Químicos
<i>Sharlab (Barcelona, Spain)</i>	Acetonitrilo, hexano, 2-propanol, tetrahidrofurano
<i>Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU)</i>	Reactivo de Bradford, BCA Protein assay kit
<i>Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)</i>	Solución 30 % acrilamida/bisacrilamida, Solución de Bisacrilamida 2%
<i>Merck (Darmstadt, Alemania)</i>	Metaperiodato de sodio
<i>GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)</i>	Marcadores de peso molecular para electroforesis de 14-97 kDa (LMW)
<i>Spectrum Labs (Breda, Holanda)</i>	Membranas de diálisis de éster de celulosa (CE) de diferentes MWCO
Proveedor	Sustratos/Productos
<i>Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EEUU)</i>	Glicerol, ácido glutámico
	Ácido fórmico
	α -cetoglutarato
	2,2',2''-trifluoroacetofenona
	Alcohol (<i>R</i>)-(-)- α -(trifluorometil)bencílico
	Alcohol (<i>S</i>)-(+)- α -(trifluorometil)bencílico
	(<i>rac</i>)-2-fenilpropanal
	(<i>S</i>)-(-)-2-fenil-1-propanol
	(<i>R</i>)-(+)-2-fenil-1-propanol
	(<i>rac</i>)-1-feniletanol
<i>Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EEUU)</i>	(<i>S</i>)-(-)-1-feniletanol
	(<i>R</i>)-(+)-1-feniletanol
	Acetofenona
	Dihidroxiacetona (DHA)

El resto de los reactivos y solventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico.

4. MÉTODOS.

4. 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ENZIMÁTICAS.

4. 1. 1. Clonaje y expresión en *E. coli* de una glicerol deshidrogenasa de *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH).

4. 1. 1. 1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Citrobacter braakii DSM 30040 (antiguamente *Citrobacter freundii*) se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ). Las cepas de *Escherichia coli* DH10B y BL21(DE3) (Invitrogen) fueron utilizadas para la clonación y expresión de la proteína de interés respectivamente. *C. braakii* fue crecida en condiciones aeróbicas en medio de cultivo agar nutritivo a 30 °C y las cepas de *E. coli* se crecieron aeróbicamente en medio de cultivo Luria–Bertani (LB) a 37 °C.

El Medio LB se preparó con 0,5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (peso/volumen) (p/v) triptona, 1% (p/v) cloruro sódico y 1 litro de H₂O destilada. El medio agar nutritivo se preparó con 0,5% (p/v) de peptona, 0,3% (p/v) extracto de carne y 1 litro de H₂O destilada (Sambrook and Russell, 2001). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final de 1,5% (p/v). Para la selección de transformantes resistentes se añadió a este medio ampicilina en una concentración final de 150 µg/ml (LBA). La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 20 min. Las cepas bacterianas se conservaron en placa a 4 °C durante un máximo de un mes y durante largos períodos de tiempo a -70 °C en 20% (volumen/volumen) (v/v) de glicerol. En el momento de inocularlas, se descongelaron y se incubaron en los medios correspondientes a 37 °C o 30 °C con una agitación de 220 rpm. Cuando fue necesario se incluyó ampicilina a una concentración de 150 µg/ml.

4. 1. 1. 2. Clonación y expresión del gen *dhaD*.

El aislamiento de ADN, purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa (*QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN), construcción de plásmidos, purificación de plásmidos (kit *High Pure Plasmid Isolation* de Roche Applied Science), análisis de restricción y secuenciación de ADN se llevaron a cabo por métodos estándar (Sambrook and Russell, 2001) o según normas de la casa comercial. El gen *dhaD* que codifica para una glicerol deshidrogenasa de *Citrobacter braakii* (AAB48844) fue amplificada por PCR con la ADN polimerasa *PrimeStar HS* (Takara) utilizando como oligonucleótidos GlyDH- 5'-ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTAttaacgcgcagccactgtg-3' y GlyDH- 5'-GGTGAACCTGTATTTCCAGGGCagtctaaaagtattcaatct-3' (los nucleótidos complementarios a la secuencia del vector de expresión se indican en mayúsculas y los nucleótidos complementarios a la

secuencia del gen *dhaD* aparecen en minúsculas). El producto de PCR fue purificado e insertado en el vector de expresión pURI3-TEV utilizando una estrategia de clonación sin utilizar enzimas de restricción y ligación anteriormente descrita (Curiel et al., 2011).

La secuenciación de ADN se realizó en el servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

4. 1. 1. 3. Producción de la enzima recombinante Cb-GyDH en *E. coli*.

Se llevo a cabo la transformación de células de *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) con el plásmido recombinante pURI3-dhaD. Las células que contenían el plásmido pURI3-dhaD se crecieron a 37 °C en medio LB que contenía ampicilina (100 µg ml⁻¹) y fueron inducidas mediante la adición de 0,4 mM de Iso-propil-1-Tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica, OD₆₀₀= 0,4. Después de la inducción, las células crecieron a 22 °C durante 20 horas y fueron recolectadas por centrifugación (12.000 rpm durante 10 min). El sistema de expresión en el plásmido pURI3-TEV dio lugar a una proteína recombinante con una etiqueta de 6 histidinas (en lo sucesivo también podrá aparecer como 6xHis o cola poliHis) en su extremo amino terminal.

4. 1. 1. 4. Purificación de la enzima Cb-GyDH.

Las células obtenidas de cada litro de cultivo, se resuspendieron en 15 mL de tampón fosfato 10 mM a pH 7 con 3 mM de benzamidina. La suspensión de células se rompió mediante French press (a 1000 psi). El lisado resultante de centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El precipitado de restos celulares resultante se descartó y el sobrenadante (en lo sucesivo denominado extracto crudo) se guardó a 4°C para su posterior purificación. Para la purificación de la proteína, las células recogidas fueron resuspendidas en tampón de purificación (Tris-HCl 10 mM, 10 mM de imidazol a pH 8.0). La Cb-GyDH fue purificada por cromatografía de afinidad. La fracción soluble fue ofrecida a Ag-IDA-Ni²⁺ activada con baja densidad de grupos quelatos metálicos previamente equilibrados con el tampón de purificación. Una vez unida la proteína al soporte, esta fue lavada 3 veces con el tampón de purificación y la proteína fue eluida con 300 mM de imidazol. El sobrenadante se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

4. 1. 2. Producción y purificación de la ADH1 recombinante de *Thermus thermophilus* HB 27 (Tt27-ADH1).

La Tt27-ADH1 (codificada por el gen TTC0002) fue clonada en el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen) y expresada en *E. Coli* BL21(DE3) por el laboratorio del profesor Berenguer, (CBMSO, UAM-CSIC). Las células de *E. coli* se lisaron por sonicación y, tras una etapa de

centrifugación (12.000 rpm durante 10 min), se obtuvo el extracto crudo proteico que fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7. La purificación se desarrolló en dos pasos, primero, una etapa de tratamiento térmico para eliminar por desnaturalización y precipitación, las proteínas del hospedador, consistente en 60 minutos a 70 °C y una segunda etapa en la que finalmente la proteína se purifica por la no adsorción al soporte Ag-IDA-Ni²⁺ (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico) ya que esta proteína fue clonada y expresada sin etiqueta de His. La suspensión se mantuvo todo el tiempo bajo agitación y, para controlar el curso de la adsorción, periódicamente se tomaron pequeñas muestras de sobrenadante, analizando su actividad y la concentración de proteínas. Después de 1 hora la suspensión fue filtrada a vacío y recuperado su sobrenadante (Rocha-Martin et al., 2009). El sobrenadante se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

4. 1. 3. Producción y purificación de la ADH2 recombinante de *Thermus thermophilus* HB 27 (Tt27-ADH2).

La Tt27-ADH2 (codificada por el gen TTC0331) fue clonada en el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen) y expresada en *E. Coli* BL21(DE3). Esta enzima fue donada por el laboratorio del profesor Berenguer, (CBMSO, UAM-CSIC). Las células de *E. coli* se lisaron por sonicación y, tras una etapa de centrifugación (12.000 rpm durante 10 min), se obtuvo el extracto crudo proteico que fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7. La purificación se desarrolló en dos pasos: primero, una etapa de tratamiento térmico para eliminar por desnaturalización y precipitación las proteínas del hospedador, consistente en 60 minutos a 70 °C; y una segunda etapa en la que finalmente la proteína se purifica por la no adsorción al soporte Ag-IDA-Ni²⁺ (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico) ya que esta proteína fue clonada y expresada sin etiqueta de His. La suspensión se mantuvo todo el tiempo bajo agitación y, para monitorizar el proceso de purificación, periódicamente se tomaron pequeñas muestras de sobrenadante, analizando su actividad y la concentración de proteínas. Después de 1 hora la suspensión fue filtrada a vacío y recuperado su sobrenadante (Rocha-Martín et al., 2012). El sobrenadante se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

4. 1. 4. Producción y purificación de la NADH oxidasa de *Thermus thermophilus* HB27 (Tt27-NOX).

Se han utilizado 6 mutantes de Tt27-NOX expresados en *E. coli*: KHY, KHH, RHH, RRH, KRY y RHY. Estas variantes fueron clonadas en el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen) y expresada en *E. Coli* BL21(DE3) y fueron donadas por el laboratorio del profesor Berenguer (CBMSO, UAM-CSIC). Después de la inducción, las células fueron rotas por sonicación y una vez sonicadas se centrifugó para eliminar los restos celulares (12.000 rpm durante 10 min), para así obtener el extracto crudo de proteínas. La purificación de Tt27-NOX se desarrolló en dos pasos y no fue igual para todas las variantes. En una primera etapa se realizó un tratamiento térmico para eliminar por desnaturalización y precipitación las

proteínas del hospedador; y una segunda etapa, en la que finalmente la proteína se purifica por la no adsorción a soportes cromatográficos Ag-PEI y/o Ag-DS según el caso.

Para las variantes KHH, KHY y RHH, el extracto crudo fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7 e incubado a 80 °C y pH 7 durante 45 min. El precipitado de proteínas agregadas fue eliminado después de centrifugar (12.000 rpm durante 10 min) y, el sobrenadante que contenía la actividad NOX fue ofrecido a los soportes cromatográficos (Ag-PEI y Ag-DS) a pH 7 y 25 °C (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico) durante 1 hora (Rocha-Martin et al., 2011).

En el caso de las variantes RHY y RRH, el extracto crudo fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7 e incubado a 70 °C y pH 7 durante 60 min. El precipitado de proteínas agregadas fue eliminado después de centrifugar (12.000 rpm durante 10 min) y, el sobrenadante que contenía la actividad NOX fue ofrecido a los soportes cromatográficos (Ag-PEI y Ag-DS) a pH 7 y 25 °C (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico) durante 1 hora. Por último, el extracto crudo que contenía la variante KRY fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7 e incubado a 70 °C y pH 7 durante 60 min. El precipitado de proteínas agregadas fue eliminado después de centrifugar (12.000 rpm durante 10 min), y el sobrenadante que contenía la actividad NOX fue ofrecido al soporte cromatográfico Ag-PEI a pH 7 y 25 °C (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico) durante 1 hora. La suspensión se mantuvo todo el tiempo bajo agitación y, para monitorizar el proceso de purificación, periódicamente se tomaron pequeñas muestras de sobrenadante, analizando su actividad y la concentración de proteínas. Después de 1 hora la suspensión fue filtrada a vacío y recuperado su sobrenadante. El sobrenadante se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

En los casos en los que se utilizó la enzima nativa, los estudios se llevaron a cabo con el extracto crudo de proteínas tras lisar las células mediante sonicación.

4. 1. 5. Producción y purificación de glutamato deshidrogenasa recombinante de *Thermus thermophilus* HB 27 (Tt27-GDH).

La GDH fue clonada en el vector de expresión pET-28b (Novagen) y expresada en *E. Coli* BL21(DE3) y fue donada por el laboratorio del profesor Berenguer, (CBMSO, UAM-CSIC). Esta proteína fue clonada y expresada con una etiqueta de 6xHis. Las células de *E. coli* se rompieron por sonicación y, tras una etapa de centrifugación (12.000 rpm durante 10 min), se obtuvo el extracto crudo proteico que fue diluido 10 veces en 10 mM de fosfato de sodio pH 7. La purificación de la GDH se desarrolló en dos pasos, primero, una etapa de choque térmico para eliminar por desnaturización y precipitación, las proteínas del hospedador, consistente en 30 minutos a 70 °C y una segunda etapa en la que finalmente la proteína se purificó, mediante cromatografía de afinidad, por adsorción selectiva a soportes agarosa-IDA-Ni²⁺ (1 g de soporte por 10 mL extracto proteico), (Armisen et al., 1999; Porath et al., 1975), obteniendo una suspensión de GDH con más del 99 % de pureza. La actividad Tt27-GDH y la concentración de proteínas se midieron periódicamente tanto en el sobrenadante como en la suspensión

para monitorizar el proceso de purificación (Bolívar et al., 2008). El sobrenadante se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

4. 1. 6. Preparación de la solución enzimática de glicerol deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans* (Gox-GyDH).

La preparación comercial de Gox-GyDH (Richter et al., 2009) se diluyó (1:2) en fosfato de sodio 10 mM a pH 7. La solución final usada presentaba una actividad enzimática de 4,8 U/mL frente al sustrato (*rac*)-2-fenilpropanal.

4. 1. 7. Preparación de la solución enzimática de formiato deshidrogenasa de *Pseudomonas* sp (Ps-FDH).

La preparación comercial de Ps-FDH se diluyó (3:100) en fosfato de sodio 5 mM a pH 7 y se dializó tres veces frente a 50 volúmenes de fosfato de sodio 10mM a pH 7. No hubo pérdida de actividad durante este procedimiento. La solución final usada presentaba 0,8 mg/mL de proteína y 3,1 U/mg de proteína.

4. 2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad redox de las diferentes oxidorreductasas utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fue medida espectrofotométricamente monitorizando la variación de la absorbancia a 340 nm, basado en la producción concomitante o consumo del correspondiente cofactor de nicotinamida. Las medidas se llevaron a cabo, bajo agitación suave y continua, al pH y temperatura indicados. El coeficiente de extinción molar (ϵ) para el NADH a 340 nm, utilizado para calcular la actividad específica (AE) fue de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\text{U/mL enzima} = \frac{[\Delta A_{340 \text{ nm}}/\text{min} - \Delta A_{340 \text{ nm}}/\text{min}(\text{blanco})] \times (\text{volumen total ensayo, mL}) \times (\text{factor dilución enzima})}{\epsilon (\text{coeficiente extinción molar}) \times (\text{Volumen en mL de enzima usada})}$$

$$\text{AE (U/mg)} = \frac{\text{Unidades/ mL enzima}}{\text{mg proteína/ mL enzima}}$$

donde ΔA_{340} es el incremento de absorbancia por minuto a una longitud de onda de 340 nm.

4. 2. 1. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-ADH1.

La actividad de la reacción de oxidación de distintas las preparaciones de Tt27-ADH1 se analizaron espectrofotométricamente monitorizando el incremento de absorbancia a 340 nm producido por la creciente generación de NADH, durante la oxidación de la mezcla racémica de 1-feniletanol (en lo sucesivo 1-feniletanol o (*rac*)-1-feniletanol). De este modo, una solución o suspensión de Tt27-ADH1 (20-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de una solución 2,5 mM de NAD⁺ conteniendo (*rac*)-1-feniletanol 100mM en fosfato de sodio 100 mM, a pH 7 y 65 °C. Se definió una unidad de actividad oxidativa (U) de Tt27-ADH1 como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de (*rac*)-1-feniletanol por minuto a pH 7 y 65 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas.

La actividad de la reacción de reducción de las distintas preparaciones de Tt27-ADH1 se midió espectrofotométricamente recogiendo la disminución de absorbancia a 340 nm promovido por la desaparición de NADH durante la reducción de la acetofenona. De este modo, una solución o suspensión de Tt27-ADH1 (20-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de acetofenona 25mM y 50 μ L de NADH 10 mM en fosfato de sodio 100 mM a pH 7 y 65 °C. Se definió una unidad de actividad reductasa (U) de Tt27-ADH1 como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de acetofenona por minuto a pH 7 y 65 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas.

4. 2. 2. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-ADH2.

La actividad de la reacción de oxidación de las distintas las preparaciones de Tt27-ADH2 se analizaron espectrofotométricamente monitorizando el incremento de absorbancia a 340 nm producido por la creciente generación de NADH, durante la oxidación del correspondiente alcohol. De este modo, una solución o suspensión de Tt27-ADH2 (20-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de una solución de 2,5 mM de NAD⁺ en fosfato de sodio 50 mM a pH 7 y 65 °C, conteniendo 25 mM del correspondiente sustrato a oxidar. Se definió una unidad de actividad oxidativa (U) de Tt27-ADH2 como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de (*rac*)-1-feniletanol por minuto a pH 7 y 65 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas.

La actividad de la reacción de reducción de las distintas preparaciones de Tt27-AD2 se midió espectrofotométricamente monitorizando la disminución de la absorbancia a 340 nm debido al consumo de NADH durante la reducción del sustrato. De este modo, una solución o suspensión de Tt27-ADH2 (20-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de del sustrato a reducir (aldehído o cetona) en la concentración indicada y 0,25 mM de NAD(P)H en fosfato de sodio 50 mM a pH 7 y 65 °C. Para ayudar a solubilizar algunos sustratos éstos se disolvieron en 50 % de 2-propanol y en el medio de reacción no supuso más de un 2 % del disolvente en el volumen total de la reacción para evitar que afectara a la actividad catalítica de la enzima. Se definió una unidad de actividad reductasa (U) de Tt27-ADH2 como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA) por minuto a

pH 7 y 65 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas. En cada caso concreto, se especifica cuando se utilizaron temperaturas o pHs diferentes.

4. 2. 3. Determinación de la actividad enzimática de la Cb-GyDH.

La actividad reductiva de las distintas preparaciones de Cb-GyDH se analizaron espectrofotométricamente monitorizando el aumento de la absorbancia a 340 nm producido por la aparición de NADH, durante la oxidación de glicerol a dihidroxiacetona (DHA). De este modo, una solución o suspensión de Cb-GyDH (20-200 µL) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de glicerol 100 mM y 2,5 mM de NAD⁺ en fosfato potásico 50 mM y sulfato amónico 30 mM, a pH 8,5 y 30 °C. Se definió una unidad de actividad reductiva (U) de Cb-GyDH como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de glicerol por minuto a pH 8,5 y 30 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas.

4. 2. 4. Determinación de la actividad enzimática de la Gox-GyDH.

La actividad reductiva de las distintas preparaciones de Gox-GyDH se analizaron espectrofotométricamente monitorizando la disminución de la absorbancia a 340 nm producido por el consumo de NADH, durante la reducción de (*rac*)-2-fenilpropanal. De este modo, una solución o suspensión de Gox-GyDH (20-200 µL) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de 1mM (*rac*)-2-fenilpropanal y 50 µL de NADPH 10 mM en fosfato de sodio 10 mM, a pH 7 y 25 °C. Se definió una unidad de actividad reductiva (U) de Gox-GyDH como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de (*rac*)-2-fenilpropanal por minuto a pH 7 y 25 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas.

4. 2. 5. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-NOX.

La actividad de diferentes preparaciones de NOX fue analizada por el descenso de la absorbancia a 340 nm correspondiente a la oxidación de NADH. Una muestra de una preparación enzimática (10-100 µL) se añadió a una celda con 2 mL de 10 mM fosfato de sodio a pH 7, 37 °C y 0,25 mM de NADH. Una unidad de NOX (U) se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de NADH por minuto a pH 7 a 37 °C. Cuando se indica, la actividad fue ensayada añadiendo FAD o FMN exógeno en concentraciones saturantes. Cuando se indica, se utilizaron diferentes valores de temperaturas y pH para realizar la medida de actividad. Una unidad de actividad NOX (U) se definió como la cantidad necesaria de enzima para oxidar 1 µmol de NADH por minuto a pH 7 y a la temperatura indicada (la actividad estándar fue a 25 °C, 37 °C o 65 °C). En cada caso concreto, se especifica cuando se utilizaron temperaturas o pHs diferentes.

4. 2. 6. Determinación de la actividad enzimática de la Ps-FDH.

La actividad del derivado PS-FDH se analizó espectrofotométricamente analizando el incremento de absorbancia a 340 nm promovido por la generación de NADH durante la oxidación de ácido fórmico. Una muestra de suspensión enzimática (10-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de ácido fórmico y 100 μ L de NAD⁺ 100 mM, en fosfato de sodio 100 mM, a pH 7 y 25 °C. Se definió una unidad de actividad (U) Ps-FDH como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ácido fórmico por minuto a pH 7 y 25 °C, en las condiciones anteriormente mencionadas

4. 2. 7. Determinación de la actividad enzimática de la Tt27-GDH.

La actividad de las diferentes preparaciones de Tt27-GDH se analizó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm correspondiente a la formación de NAD(P)H concomitante a la oxidación de ácido glutámico. Una muestra de preparación de GDH, soluble o suspensión enzimática (20-200 μ L) se añadió a una cubeta de cuarzo con 2 mL de ácido glutámico 250 mM y 100 μ L de NAD(P)⁺ 100 mM preparado en 100 mM de fosfato de sodio a pH 8 y 66 °C. En cada caso concreto, se especifica cuando se utilizaron temperaturas o pHs diferentes. La actividad reductora, hacia el α -cetoglutarato se analizó midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm promovido por la oxidación del NADH. Para ello una muestra de preparación GDH (20–200 μ L) se añadió a 2 mL de α -cetoglutarato 250 mM y 100 μ L de NADH 10 mM en fosfato de amonio 100 mM y 66 °C al pH especificado en cada caso. Se definió una unidad de actividad (U) Tt27-GDH, como la cantidad de enzima que se requiere para oxidar 1 μ mol de ácido glutámico por minuto a pH 8 y 66 °C.

4. 3. PREPARACIÓN DE SOPORTES SOBRE AGAROSA BCL.

En lo sucesivo lo denominado como soporte agarosa o simplemente agarosa se refiere a agarosa BCL (beads crosslinked). El grado de entrecruzamiento 4, 6, 10 BCL se indica en cada caso. Se ha procurado sistematizar la nomenclatura de los soportes activados denominándolos en primer lugar por el nombre del soporte o resina y, a continuación, los grupos con los que ha sido activado el soporte.

4. 3. 1. Preparación de agarosa glioxil (Ag-Glx).

Se preparó tal como describió (Guisán, 1988). Los soportes Ag-Glx se activaron con diferentes densidades de grupos glioxil, controlando la cantidad de metaperiodato de sodio añadido (cada mol del oxidante genera un mol de grupo glioxil) (Fernández-Lafuente et al., 1993; Guisán, 1988). Para cuantificar los grupos glioxil (μ moles grupos glioxil/ mL de gel) introducidos 20 μ L de una dilución

apropiada de blanco se mezcló con una disolución 1:1 de KI 10 % y una disolución saturada de NaHCO_3 . Se midió la absorbancia a 435 nm y se compararon los valores obtenidos antes y después de la oxidación frente a patrones de NaIO_4 (Guisán, 1988).

4. 3. 2. Preparación de agarosa mono-aminoetil-N-etil (Ag-MANAE).

Tal y como describieron (Fernandez-Lafuente et al., 1993), 10 g de soporte Ag-Glx fueron suspendidos en 90 mL de etilendiamina 2 M a pH 10. La suspensión resultante fue agitada suavemente durante 2 horas, tras las cuales se añadió 1 g NaBH_4 y el soporte se redujo durante 2 horas. Los soportes reducidos se filtraron y lavaron en el siguiente orden: primero con 100 mL de acetato de sodio 100 mM a pH 5, segundo con 100 mL de tampón bicarbonato de sodio pH 10, después con una solución de NaCl 1 M pH 10 y finalmente con 500 mL de agua destilada.

4. 3. 3. Preparación de agarosa polietilenimina (Ag-PEI).

Se preparó partiendo de Ag-Glx como describieron (Mateo et al., 2000). Se pesó la cantidad necesaria de PEI y se disolvió en H_2O destilada en una relación 1/10, de tal forma que hubo 1g de PEI por mL de Ag-Glx. Una vez disuelta la PEI, se incubó junto a los gramos correspondientes de Ag-Glx en tampón bicarbonato 100 mM pH 10 a 25 °C. Esta suspensión se incubó 3 horas bajo agitación suave. Después la suspensión se redujo con NaBH_4 a pH 10, 10 mg/l, durante 2 horas a 25 °C bajo agitación suave. Una vez reducido el soporte, se lavó con tampón acetato de sodio 100 mM pH 4 y después con tampón borato de sodio 100 mM pH 9. Por último, se lavó el soporte con NaCl 1M, para eliminar la PEI unida no covalentemente al soporte y finalmente con H_2O destilada.

4. 3. 4. Preparación de agarosa dextrano-sulfato (Ag-DS).

Se preparó mediante el protocolo descrito por (Fuentes et al., 2004). 5 g de Ag-MANAE se añadieron a una disolución que contenía 400 mg/mL de dextrano-sulfato (DS) de 500 kDa por gramo de soporte (5 g de soporte y 4 g de DS) disueltos en 10 mL de 25 mM de fosfato de sodio pH 7. La mezcla se incubó durante 16 horas a 25 °C bajo agitación suave. Después, el soporte se lavó con 1 L de fosfato de sodio 100 mM a pH 7 bajo agitación suave durante 1 hora, para disminuir la viscosidad del DS. Después, el soporte se lavó con abundante agua destilada para eliminar el exceso de SD.

4. 3. 5. Preparación de agarosa epóxido.

Se activó la agarosa con epóxidos mediante epíclorhidrina tal como describieron (Mateo et al., 2007c). Se incubaron 100 g de agarosa 4BCL en una disolución de 160mL de acetona en 440 mL de agua, conteniendo 2 g de borohidruro de sodio, 1 N de NaOH a 4 °C. Se añadieron 110 mL de epíclorhidrina lentamente a 4 °C. Después de la adición de la epíclorhidrina, se incubó a temperatura ambiente durante 16 h sometida a agitación suave. Finalmente, se filtró el soporte y se lavó abundantemente con agua destilada.

4. 3. 6. Preparación de soportes cromatográficos de afinidad (soportes IMAC).

Se preparó como se describe en (Armisen et al., 1999) (**Figura 4. 1**). La preparación de soportes Ag-IDA-Cu⁺² o Ag-IDA-Ni²⁺ se llevó a cabo en dos etapas. En la primera parte 7 g de agarosa-epóxido (35 µmoles de grupos epóxidos/g de soporte) fueron resuspendidos en 10 mL de una solución tampón de borato sódico 0,1M conteniendo 2M de ácido iminodiacético (IDA) a pH 11. La suspensión se agitó durante 4h a 25 °C y posteriormente fue filtrada a vacío y lavada con abundante agua destilada. De esta manera, se obtuvo un soporte Ag-IDA de 35 µmoles de grupos IDA/g de soporte, es decir un soporte totalmente activado con grupos IDA. En la segunda parte, dos gramos del soporte agarosa-IDA fueron incubados en una solución de CuSO₄ (II)*5H₂O o NiCl₂*6 H₂O (30 mg/mL) durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, el soporte fue filtrado y lavado con abundante agua destilada y almacenado a 4 °C hasta su uso.

Así, el metal queda coordinado por 3 sitios, dejando los restantes sitios de coordinación del metal disponibles para unirse con el nitrógeno desprotonado del grupo imidazol de la His, formándose un complejo ternario IDA-ión metálico-proteína. El ión metálico actúa principalmente como aceptor de electrones; sin embargo, la previa formación del complejo ligando-metal coordinado con moléculas de agua es necesaria, debido a que la interacción con la proteína ocurre fundamentalmente por la sustitución de estas moléculas de agua por los residuos aminoácidos que actúan como donadores de electrones (Porath, 1992).

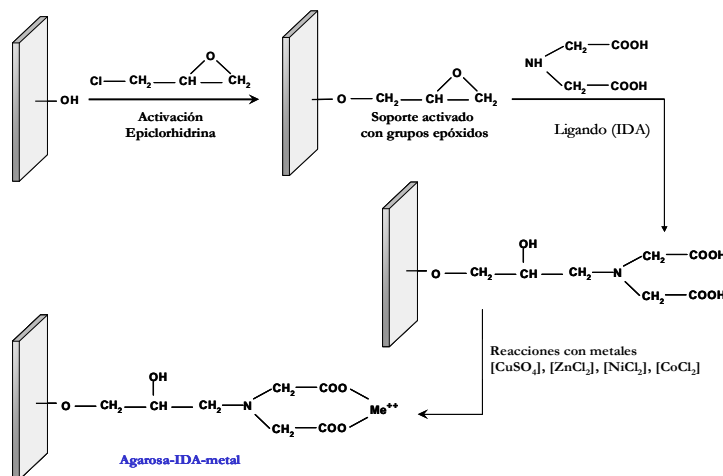


Figura 4. 1. Activación de soportes agarosa para cromatografía IMAC.

4. 3. 7. Preparación de los soportes heterofuncionales.

4. 3. 7. 1. Activación de agarosa con grupos epóxidos.

Estos soportes, partieron todos de una agarosa activada con grupos epóxido preparada como se ha descrito en el apartado 4. 3. 5.

Para la cuantificación de los grupos epóxido, 1 g de soporte fue tratado con 10 mL de H_2SO_4 0,5 M durante 2 horas para hidrolizar los grupos epóxidos. El soporte hidrolizado fue oxidado con NaIO_4 . El número de grupos epóxidos fue calculado por la diferencia en el consumo de periodato entre el soporte hidrolizado y el soporte epóxido inicial. El consumo de periodato fue cuantificado utilizando yoduro potásico como previamente se ha descrito en (Guisán, 1988).

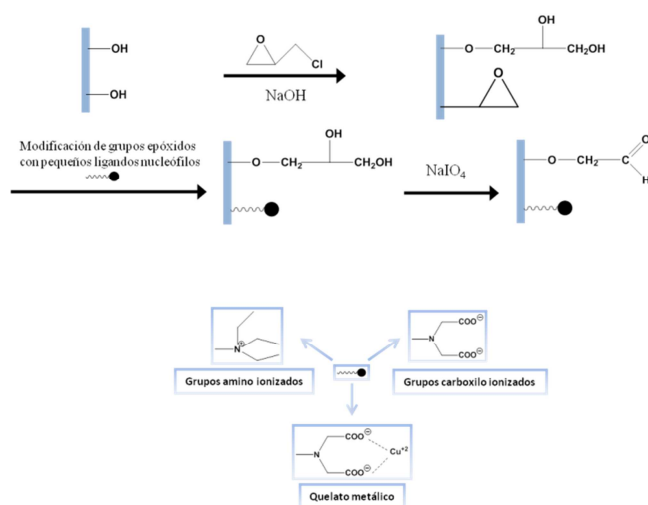
4. 3. 7. 2. Modificación del soporte agarosa epóxido con diferentes grupos reactivos.

El soporte agarosa epóxido fue modificado con diferentes grupos reactivos (Mateo et al., 2010). En todos los casos, la proporción en la solución del reactivo modificador/soporte fue 1/10 (p/v).

- Soporte catiónico: el soporte agarosa epóxido fue modificada con 1 M de trietilamina en 50% agua/acetona a pH 12 durante 24 horas en agitación suave a 25 °C.
- Soportes aniónicos carboxilo-glioxil (Ag-IDA-Glx): la agarosa epóxido fue tratada con 0,5 M ácido iminodiacético a pH 11 durante 24 horas en agitación suave a 25 °C. Por último, se lavó el soporte con abundante agua destilada.
- Soportes quelatos metálicos heterofuncionales (Ag-IDA- Cu^{2+} -Glx y Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx): el soporte aniónico carboxilo-glioxil fue modificado con una solución de 30 mg/mL de una de las siguientes sales metálicas, CuSO_4 o NiCl_2 , a pH 7, 25 °C durante 1 hora en agitación suave. Pasado este tiempo se lavó el soporte con abundante agua destilada.

- Soporte boronato: el soporte agarosa epóxido fue modificado con 5% ácido *p*-aminofenil borónico, disuelto en 20% de dioxano a pH 11 durante 24 horas a 25°C. Por último se lavó el soporte con abundante agua destilada.

Finalmente, una vez que los soportes fueron activados con los diferentes grupos funcionales, los dioles generados por hidrólisis espontánea de los grupos epóxido del soporte se oxidaron con metaperiodato de sodio, según se ha descrito en (Guisán, 1988).



Esquema 4. 2. Preparación de soportes agarosa glioxil heterofuncionales. Ejemplos de grupos reactivos: trietilamina, ácido iminodiacético y CuSO_4 .

4. 3. 7. 3. Preparación de soportes heterofuncionales agarosa glioxil disulfuro (Ag-S-Glx).

Partiendo de agarosa epóxido, tal como describieron (Godoy et al., 2011a), este soporte se preparó de la siguiente forma:

Hidrólisis parcial de epóxidos: soporte epóxido gliceril. El soporte agarosa epóxido se filtró y se resuspendió en 1L de una disolución 100mM de H_2SO_4 durante 2 horas bajo agitación y posteriormente se lavó con H_2O destilada.

Oxidación con NaIO_4 : soporte glioxil epóxido. Se disolvieron 300 μmol de NaIO_4 por cada gramo de soporte en 1,5 L de agua. Se reservaron cerca de 100 μL de esta disolución (*blanco*). La disolución restante se incubó junto al soporte epóxido-gliceril durante 2 horas. Se tomó una alícuota de 100 μL del sobrenadante resultante para la determinar el consumo de periodato (igual a los grupos glioxil producidos en el soporte) y se comparó con el *blanco*. Se midió la absorbancia a 435 nm y se compararon los valores obtenidos antes y después de la oxidación frente a patrones de NaIO_4 (Guisán, 1988). El soporte resultante de la oxidación (glioxil epóxido) se reserva para el siguiente paso.

Tratamiento con Na_2S : soporte tiol- glioxil. Al soporte glioxil epóxido se le adicionó una disolución acuosa de 2 L de Na_2S 10mM y NaHCO_3 100 mM ajustada a pH 10. Esta mezcla se incubó 30 minutos con agitación suave. El soporte se filtró y se lavó con abundante agua destilada.

Tratamiento con 2,2'-ditiodipiridina: soporte disulfuro- glioxil y cuantificación de grupos intercambiados. El soporte tiol-glioxil se mezcló con el sobrenadante de una disolución saturada de 2,2'-ditiodipiridina (~100 mg en 1,5 L agitados por 30 minutos y posteriormente filtrada). Un alícuota de 1mL de esa disolución se reservó como blanco. La mezcla se agitó en palas al menos 1,5 h. 1mL del sobrenadante resultante se reservó para análisis. La mezcla restante se filtró y lavó como se indicó anteriormente y después se guardó a 4°C. Para la cuantificación de grupos disulfuro en el soporte, se midió la absorbancia del blanco y del sobrenadante a 343nm frente agua destilada. El coeficiente de extinción molar para la 2-tiolpiridina que se libera como efecto de la reacción de intercambio entre la 2,2'-ditiodipiridina y el grupo tiol en el soporte, es igual a $8,08 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4. 4. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS.

4. 4. 1. Generalidades.

En todos los casos, una disolución enzimática de concentración dada al pH y condiciones que se indican se incubó con una determinada cantidad de soporte. Se tomaron muestras de sobrenadantes y suspensión total a diferentes tiempos, además del blanco (suspensión enzimática incubada en las mismas condiciones con soporte inerte) y se determinó su actividad o la cantidad de proteína, para evaluar el proceso de inmovilización. En lo sucesivo, la enzima unida al soporte se denominará derivado o derivado inmovilizado.

Los estudios de estabilidad de los diferentes catalizadores se llevaron a cabo con derivados cargados con 4 U/g o menor carga enzimática, para evitar los problemas difusionales que pudieran alterar el análisis de los resultados.

Como protocolo general para Tt27-ADH1, Tt27-ADH2, Cb-GyDH, Tt27-NOX y Tt27-GDH se suspendieron 2 g de soporte en una suspensión enzimática de 20 mL de volumen total conteniendo 8 U de Tt27-ADH1.

Como protocolo general para la Ps-FDH se suspendieron 3 g de soporte en 17 mL de una suspensión conteniendo 2,25 mL de Ps-FDH soluble en las condiciones pertinentes en cada caso.

En lo sucesivo, se denominará derivado el resultante de la inmovilización de una enzima en un soporte dado.

4. 4. 2. Inmovilización sobre soportes por adsorción física mediante intercambio iónico.

4. 4. 2. 1. Inmovilización sobre intercambiadores aniónicos: agarosa dietilaminoetil (DEAE Sepharose®), agarosa monoamino-N-aminoetil (Ag-MANAE), agarosa polietilenimina (Ag-PEI) y Q- Sepharose®.

Como procedimiento general 2 g de del soporte se incubaron en 20 mL de una suspensión enzimática en fosfato de sodio 10 mM a pH 7, la suspensión se agitó suave a 25 °C durante el tiempo necesario. Finalmente el derivado se filtró y se lavó con tampón fosfato 10 mM pH 7.

En el caso concreto de la co-immobilization de Gox-GyDH y Ps-FDH (sistema A) en Ag-MANAE, 2 g del soporte iónico fueron incubados con 20 mL de fosfato de sodio 10 mM pH 7 conteniendo 0,78 U/mL de Gox-GyDH. La suspensión se agitó suavemente a 25 °C. Una vez, que la Gox-GyDH fue inmovilizada, el derivado fue filtrado a vacío para eliminar la Gox-GyDH no unida, y se incubó con 20 mL de una solución 0,26 U/mL de Ps-FDH en 10 mM de fosfato sódico pH 7 y 25 °C. En paralelo, ambas enzimas se inmovilizaron por separado en Ag-MANAE.

4. 4. 2. 2. Inmovilización sobre intercambiadores catiónicos: inmovilización en agarosa dextrano sulfato (Ag-DS), Carboximetil Sepharose® y Sulfopropil Sepharose®.

Como procedimiento general se incubaron 2 g de soporte en 20 mL de una suspensión enzimática de fosfato de sodio 10 mM a pH 7. La suspensión se sometió a agitación suave a 25 °C y finalmente se filtró y se lavó con tampón fosfato 10 mM pH 7.

4. 4. 3. Inmovilización en soportes cromatográficos de afinidad Cu^{2+} o Ni^{2+} (Ag-IDA- Cu^{2+} o Ni^{2+}).

La inmovilización se llevo a cabo añadiendo 2 gramos de soporte IMAC (abreviaturas en inglés de Immobilized-Metal Affinity Chromatography) a 20 ml de fosfato de sodio 10 mM y pH 7, que contiene 8 U de una enzima dada. La suspensión se agitó suavemente a 25°C. Después, se filtró la suspensión y se lavo con fosfato de sodio 10 mM y pH 7.

4. 4. 4. Inmovilización mediante unión covalente.

4. 4. 4. 1. Inmovilización en soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (BrCN Sepharose®).

La inmovilización se llevo a cabo en condiciones suaves para tener una preparación enzimática con propiedades similares a la enzima nativa (Godoy et al., 2011b, Mateo et al., 2005), pero donde las interacciones intermoleculares no son posibles. Como protocolo general 2 g de soporte se incubaron en un

determinado volumen de una suspensión enzimática en fosfato de sodio 10 mM a pH 7 a la 4 °C (en lo sucesivo denominada condiciones suaves de inmovilización) o 25 °C (en cuyo caso se indica) durante diferentes tiempos sometido a agitación suave. Después de la inmovilización, el derivado se filtró a vacío y se lavó con tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y se incubó en una disolución de etanolamina 1M a pH 8 durante 2 h para bloquear los grupos BrCN remanentes. Finalmente la preparación se lavó con agua destilada.

4. 4. 4. 2. Inmovilización en soportes activados con grupos glioxil (Ag-Glx).

El derivado se preparó incubando 2 g de soporte Ag-Glx en una suspensión enzimática de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10,05 a 4 °C o a 25 °C bajo agitación suave, según se indica en cada caso, durante un tiempo variable, según el estudio de la inmovilización que se pretende. Finalmente los derivados se redujeron con borohidruro de sodio a 1 mg/mL en una suspensión 1:10 soporte/volumen total (en algunos casos fue necesario añadir bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10,05 inmediatamente antes de reducir para cumplir esta relación) durante 30 min a 25 °C (Mateo et al., 2006). Finalmente el derivado se filtró y se lavó con agua destilada y fosfato de sodio 10 mM a pH 7.

En el caso de la Cb-GyDH, se utilizaron como tampón de inmovilización, aparte de bicarbonato de sodio, trietilamina y ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico (CAPS) a pH 10,05. Además, cuando se indica se utilizaron aditivos como polietilenglicol de 600 (PEG600), glicerol y trehalosa, en concentraciones entre 10-40 % del volumen total.

En el caso concreto de la inmovilización de FDH en Ag-Glx se llevó a cabo ofreciendo 3 g de soporte a 17 mL de una solución de bicarbonato sódico 100mM que contenía 2,25 mL de FDH soluble (1 mg proteína/ mL) a pH 10,05. La suspensión se agitó suavemente a 4 °C hasta que no se evidenció actividad enzimática en el sobrenadante. En ese momento se agregaron 20 mg de NaBH₄ (1 mg/mL) y, después de 30 min, el derivado inmovilizado se filtró a vacío y lavó con abundante agua y fosfato de sodio 100 mM pH 7.

En lo sucesivo, se denominará grupo glioxil al grupo aldehído del tipo: soporte-O-CH₂-CHO.

Inmovilización en Ag-Glx a pH 7 (Bolívar et al., 2009a). La inmovilización se llevo a cabo añadiendo 2 gramos de soporte Ag-Glx a 20 mL de fosfato de sodio 100 mM pH 7 que contenían 8 U de la enzima correspondiente. La suspensión se agitó suavemente a 25°C. Después la suspensión se filtro, y se incubo a 25°C en 20 mL de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,05 durante varias horas para favorecer la unión covalente multipuntual. Finalmente, los derivados se redujeron a 25°C durante 30 minutos mediante la adición de borohidruro de sodio 1 mg/mL. Finalmente el derivado se lavó con fosfato de sodio 10 mM y pH 7.

Inmovilización en Ag-Glx pH 7 en presencia de ditioneitol (DTT) (Bolivar et al., 2009b). En este caso la inmovilización se realizó del mismo modo que en el apartado anterior, pero en este caso la incubación a pH 7 se llevo a cabo en presencia de 50 mM de DTT.

4. 4. 4. 3. Inmovilización en soportes agarosa heterofuncionales.

La inmovilización sobre soportes heterofuncionales se realizó en dos etapas. El primer paso fue la adsorción física de la enzima al soporte a pH 7, para ello, la inmovilización se llevo a cabo añadiendo 2 gramos de soporte heterofuncional a 20 mL de fosfato de sodio 10 mM pH 7 que contenían una concentración de enzima dada. Después, se filtró la suspensión a vacío y se incubó en 20 mL de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,05.

Cuando se utilizó un soporte heterofuncional activado con quelatos metálicos, antes de la reducción, el metal fue eliminado del soporte con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), después se redujo a 25°C durante 30 minutos mediante la adición de borohidruro de sodio 1 mg/mL en 20 mL de bicarbonato de sodio 100 mM pH 10,05.

En el caso concreto de la co-inmovilización de Cb-GyDH yTt27-NOX (sistema B) en soportes agarosa heterofuncionales Ag-IDA-Ni²⁺-Glx, la inmovilización se desarrolló del siguiente modo: 9,2 U de Tt27-NOX soluble en 100 mM de carbonato sódico pH 10,05 se incubaron con 1 g de Ag-IDA-Glx. La suspensión se agitó suavemente durante 18 horas a 25 °C. Una vez que la Tt27-NOX fue inmovilizada, se filtro el derivado y se lavo con fosfato de sodio 10 mM pH 7 para eliminar la enzima no inmovilizada. El derivado fue reducido con 1 mg/mL de NaBH₄ durante 30 minutos a 25 °C. Después de la reducción, el derivado fue lavado con un exceso de fosfato de sodio 10 mM pH 7. Más tarde, el derivado con la Tt27-NOX inmovilizada fue incubado con 10 mg/mL de NiSO₄ para introducir el metal de la superficie del soporte. Finalmente, el derivado fue equilibrado con fosfato de sodio 10 mM pH 7 y se añadió a una disolución de 10 ml de 50 mM de fosfato sódico a pH 7 que contenía 8 U de Cb-GyDH. La suspensión se agitó suavemente a 25 °C. Una vez inmovilizada la enzima, se filtró y se lavó el soporte con 10 mM de fosfato de sodio a pH 7 y se guardó a 4 °C hasta su uso. En paralelo, cada enzima se inmovilizó por separado. Cb-GyDH se inmovilizó en Ag-Ni²⁺-Glx a pH 10 y Tt27-NOX se inmovilizó en Ag-IDA-Ni²⁺ a pH 7.

La co-inmovilización de Tt27-ADH2 y Tt27-GDH (sistema C) en soportes agarosa heterofuncionales Ag-IDA-Ni²⁺-Glx se llevó a cabo del siguiente modo: la inmovilización se llevó a cabo por la adición de 1 g de Ag-IDA-Ni²⁺-Glx a 10 ml de fosfato de sodio 50 mM pH 7 conteniendo 4 U Tt27-GDH soluble. La suspensión se agitó suavemente a 25 °C. Una vez inmovilizada la enzima, el derivado se filtró y lavó con 10 mM de fosfato de sodio pH 7. Después, el derivado fue incubado con 10 ml de carbonato sódico 100 mM pH 10,05 conteniendo 1,4 U de Tt27-ADH2 soluble durante 18 horas a 25 °C. Una vez inmovilizada la segunda enzima, el derivado fue lavado con 5 volúmenes de 50 mM de EDTA a pH 7 antes del paso de reducción. El derivado sin el metal fue reducido durante 30 minutos a 25

°C con 1 mg/mL de NaBH₄. Por último, el derivado fue filtrado y lavado con fosfato sódico 10 pH 7. Cuando se indica la co-inmovilización de Tt27-GDH y Tt27-ADH fue llevada a cabo en presencia de 0,2 M de imidazol. En paralelo, ADH2 y Tt27-GDH se inmovilizaron por separado en Ag-Ni⁺²-Glx y Ag-IDA-Ni⁺² a pH 10 y 7 respectivamente.

4. 5. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE ENZIMAS. ENTRECRUZAMIENTO CON DEXTRANO-ALDEHÍDO.

4. 5. 1. Preparación de dextrano-aldehído.

Se obtuvo por oxidación con metaperiodato de sodio de los dioles vecinales presentes en las moléculas de glucosa que forman la molécula de dextrano, generando grupos aldehído. La oxidación total se obtuvo añadiendo 2 moles de periodato de sodio por molécula de glucosa siendo una reacción totalmente estequiométrica y rápida. La disolución oxidada se dializó para eliminar moléculas de bajo peso molecular. Disminuyendo la cantidad de periodato de sodio fue posible realizar oxidaciones parciales del dextrano.(Guisán et al., 1997).

4. 5. 2. Entrecruzamiento de enzimas inmovilizadas con dextrano-aldehído.

Un derivado inmovilizado de la correspondiente enzima se modificó con dextrano-aldehído (dex-CHO) mediante la aplicación del protocolo descrito por (Betancor et al., 2003; Fernández-Lafuente et al., 1999). Se utilizó dextrano totalmente oxidado para llevar a cabo la modificación. 5 gramos de derivado fueron incubados con 25 mL de 16 mg/mL de dextrano en 0,2 M de fosfato de sodio pH 7 a 4 °C. Al final del tratamiento, se incubó durante 30 minutos la preparación en 50 mL de bicarbonato de sodio 0,1 M y pH 10,05 que contenía 1 mg/mL de borohidruro de sodio. Después de los 30 minutos, se lavó la preparación con fosfato de sodio 5 mM pH 7. En el caso concreto de la Tt27-NOX se estudiaron las variables: tamaño de dex-CHO (de 1 a 200 kDa), concentración de dex-CHO por mg de proteína (de 3 a 40 mg/mg proteína), tiempo (de 3 a 48 horas) y temperatura de incubación (4 °C o 25 °C). Después del tiempo correspondiente, el derivado se incubó en bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 hasta un volumen final de 10 mL conteniendo 1 mg/mL de borohidruro de sodio. La suspensión se agitó suavemente a 25 °C durante 2 h. Finalmente el derivado se filtró y se lavó con fosfato de sodio 10 mM a pH 7.

4. 6. EFECTO DE TEMPERATURA Y pH EN LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA SOLUBLE Y LA ENZIMA INMOVILIZADA.

La actividad de la enzima soluble y/o la inmovilizada en BrCN Sepharose[®] se ensayaron a diferentes temperaturas en 50 mM del tampón correspondiente a diferentes valores de pH (pH 5, 6, 7 y 8) y temperaturas (de 25 a 90 °C). Los sistemas de tampón utilizados fueron: acetato sódico (pH 5), citrato sódico (pH 6), fosfato sódico (pH 7 y 8) y bicarbonato sódico (pH 9 y 10). Valores de pH por debajo de 5 no se midieron debido a la baja estabilidad del NADH en el caso de reacciones de reducción. Todos los pHs fueron ajustados a la temperatura correspondiente mediante un medidor de pH equipado con sensor de temperatura. La actividad fue medida durante los 100 primeros segundos. En el caso concreto de la Tt27-NOX, cuando lo indicamos, se añadió FAD o FMN exógeno a la celda de medida.

4. 7. EFECTO DEL FAD Y FMN EXÓGENO EN LA ACTIVIDAD DE LA Tt27-NOX SOLUBLE E INMOVILIZADA.

La actividad de la Tt27-NOX recombinante y nativa en forma soluble e inmovilizada en BrCN Sepharose[®] se ensayaron a diferentes concentraciones de FAD y FMN en tampón fosfato 10 mM a pH 7 y 37 °C. Consideramos concentraciones saturantes de FAD o FMN una concentración de 150 µM. La actividad se midió durante los 100 primeros segundos de reacción.

4. 8. EFECTO DE LA INCUBACIÓN DE LA Tt27-NOX A ALTAS TEMPERATURAS.

Como protocolo general cada un tiempo dado o a la temperatura indicada se tomaron las muestras necesarias para medir la actividad enzimática (según se ha descrito) de las soluciones enzimáticas solubles y/o inmovilizadas. Consideramos concentraciones saturantes de FAD o FMN una concentración de 150 µM.

Se estudió este efecto determinando la actividad enzimática a lo largo de 3 horas de la Tt27-NOX recombinante soluble incubada en tampón fosfato 10 mM a pH 7 y 80 °C, tanto en condiciones limitantes de FAD exógeno como en condiciones saturantes de FAD, además de incubada a 70 °C en condiciones limitantes de FAD. También se determinó la actividad de la enzima inmovilizada en BrCN Sepharose[®] incubada a 80 °C sin FAD exógeno en tampón fosfato 10 mM a pH 7.

A partir del estudio del efecto de la temperatura en la enzima soluble preincubada a 80 °C durante 45 minutos y la enzima soluble sin incubación a alta temperatura se halló la gráfica (ln actividad enzimática frente a la inversa de la temperatura en kelvins, K) y ecuación de Arrhenius. Por tanto, se

determinó la actividad de estas soluciones enzimáticas de 25 °C a 95 °C a pH 7. La regresión lineal fue calculada para cada muestra dando lugar a las ecuaciones correspondientes. Según la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(K) = \ln(A) - (E_a/R) * (1/T)$$

donde k es una constante cinética dependiente de la temperatura, A es el factor de frecuencia, E_a es la energía de activación, R es la constante universal de los gases (8,3143 J/(K*mol)). Por tanto, con la pendiente (m) obtenida de la recta se calculó la E_a ($m = -E_a/R * T$).

Cuando se estudió el efecto del pH (6, 7 y 8) en la incubación de la enzima soluble a 80°C en condiciones limitantes de FAD/FMN, se recogieron muestras cada cierto tiempo durante 2 horas.

4. 9. DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE H₂O₂ POR Tt27-NOX.

Un ensayo de actividad enzimática de Tt27-NOX se llevó a cabo sin añadir FAD o FMN hasta consumir totalmente el NADH añadido. Del sobrenadante de la reacción se tomó una muestra de 50 µL y se comprobó la presencia de H₂O₂ en un segundo ensayo a 25°C. Este segundo ensayo consistió en una mezcla de 1 mL de tampón fosfato potásico 50 mM y citrato de sodio 50 mM a pH 6,5 que contenía 0,5 mM de 3,3'-dimetoxibencidina y 7 U de peroxidasa, al que se añadió la muestra obtenida del primer ensayo. El incremento en la absorbancia a 460 nm se comparó con una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de H₂O₂ (de 0 a 88 µM). El ensayo no fue alterado por el NADH residual procedente del ensayo de la actividad NOX. La disminución de NADH en el primer ensayo se relacionó con la cantidad de H₂O₂ medida en el segundo ensayo.

4. 10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA.

4. 10. 1. Medida mediante el método de Bradford.

Se midió mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar para la recta de calibrado. Se ha trabajado con dos rectas de calibrado: una para concentraciones de proteína menores (0-25 µg/mL) y otra para valores de proteína mayores (0-1,5 mg/mL) (según indicaciones del fabricante, www.piercenet.com).

La cantidad de proteína unida a los soportes fue determinada como la diferencia entre la concentración de proteínas del sobrenadante al inicio de la inmovilización y la concentración final de proteínas en el sobrenadante.

4. 10. 2. Medida mediante el método BCA.

De forma complementaria, en los casos indicados, la cuantificación de proteína tanto en soluble como en fase sólida se determinó mediante el método de ensayo usando el kit con ácido BCA (basado en el método del ácido bicinonínico de medida de concentración de proteínas), (Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988) y el protocolo establecido por el fabricante (www.piercenet.com), con una recta de calibrado entre 0,02 y 2 mg/mL.

4. 11. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS.

Los parámetros cinéticos se calcularon mediante la medida de la velocidad inicial como se ha descrito en la bibliografía (Cleland, 1967a, b). La actividad de cada concentración de sustrato se determinó por triplicado, dando un valor que fue la media para cada concentración de sustrato. Todos los valores medios fueron ajustados al modelo de Michaelis-Menten basado en una regresión no lineal utilizando Microsoft Excel 2007 (De Levie, 2001).

Para la Tt27-ADH2, la cinética del estado estacionario oxidativo fue calculado frente a diferentes concentraciones de (*rac*)-1-feniletanol (1-100 mM) y NAD^+ (0,005-1 mM). Por el contrario, los parámetros cinéticos reductivos se calcularon hacia diferentes concentraciones de TFA (0,1-10 mM) y NADH (0,003-0,5 mM).

En el caso de las distintas variantes de Tt27-NOX los parámetros cinéticos se calcularon a 25 °C en 50 mM de fosfato de sodio y pH 7, a diferentes concentraciones de NADH y con 50 μM de cofactor de flavina. Para el cálculo de los parámetros cinéticos del FAD y FMN, se utilizó 10 μM de NADH.

Los parámetros cinéticos de los diferentes sistemas bio-redox inmovilizados fueron calculados hacia el NADPH, NAD^+ y NADH midiendo la velocidad inicial para la producción de (*S*)-(-)-2-fenil-1-propanol, dihidroxiacetona y alcohol (*S*)-(+)- α -(trifluorometil) bencílico respectivamente. Las velocidades iniciales para cada concentración de cofactor redox fueron repetidas por triplicado, calculándose el valor medio para cada concentración de cofactor redox.

4. 12. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN NO COMPETITIVA.

La inhibición por DHA fue determinada mediante un ensayo estándar en la celda de medida donde se fijaron varias concentraciones de DHA (0, 0,25 mM y 0,5 mM), la concentración de NAD^+ (4,3 mM) y la de la enzima (0,4 U/mL), mientras que se varió la cantidad de glicerol (sustrato) de 0 a 100 mM. De este modo se obtuvo una gráfica de dobles recíprocos de la velocidad inicial de la reacción frente

a la concentración de glicerol en presencia de diferentes concentraciones de DHA. Cada punto de la gráfica fue el resultado del cálculo del valor medio de 3 repeticiones de cada experimento.

El cálculo de la IC₅₀ para los diferentes derivados inmovilizados y la enzima soluble se realizó mediante la fijación de la concentración de enzima soluble o inmovilizada (0,4 U/mL), la concentración de NAD⁺ (4,3 mM) y la de glicerol (100 mM), variando la concentración de DHA (de 0 a 6 mM). Esta IC₅₀ hace referencia a la concentración de DHA necesaria para inhibir la actividad enzimática un 50 %. Los valores de IC₅₀ fueron calculados a partir de la gráfica de dobles recíprocos descrita en el párrafo anterior. La inhibición por DHA fue modelada según la teoría de inactivación propuesta por (Sadana and Henley, 1987). Los parámetros, en este caso, de inhibición fueron determinados mediante el ajuste de los datos experimentales al mejor modelo, el cual se basó en un mecanismo de inactivación bifásico con actividad residual.

4. 13. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE PREPARACIONES ENZIMÁTICAS.

En general, la vida media de los derivados inmovilizados fue calculada según la teoría de inactivación propuesta por (Sadana and Henley, 1987). Los parámetros de inactivación fueron determinados mediante el ajuste de los datos experimentales al mejor modelo posible (monofásico, monofásico con actividad residual, bifásico o bifásico con actividad residual).

4. 13. 1. Inactivaciones térmicas de diferentes preparaciones.

Las diferentes preparaciones (soluble e inmovilizada) fueron incubadas, en una relación 1/10 (enzima inmovilizada o soluble/ volumen), a las temperaturas y pHs indicados. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y su actividad enzimática residual fue medida como previamente se ha descrito.

4. 13. 2. Inactivaciones y actividad catalítica en presencia de disolventes orgánicos.

Las diferentes preparaciones (soluble e inmovilizada) fueron incubadas, en una relación 1/10 (enzima inmovilizada o soluble/ volumen), a las temperaturas, pHs y concentraciones de disolventes indicados. Como disolventes orgánicos se utilizaron dioxano (1,4-dioxano), diglime (bis(2-methoxyethyl ether)) y 2-propanol según el caso concreto. Cuando se indica, la medida de actividad enzimática se llevó a cabo *in situ* en la cubeta espectrofotométrica a la temperatura y pH indicados, añadiendo el correspondiente porcentaje o concentración de disolvente orgánico. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y su actividad enzimática residual fue medida como previamente se ha descrito.

4. 13. 3. Estabilidad en presencia de agentes caotrópicos.

Todas las inactivaciones se llevaron a cabo en una relación 1/10 (p/v). Los derivados se incubaron en 50 mM de fosfato de sodio que contiene guanidina-HCl 8 M a pH 7 y 25 °C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se midió la actividad residual como se ha descrito anteriormente.

4. 14. REACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.

Diferentes preparaciones de la enzima correspondiente inmovilizada, después de inactivarlas en altas concentraciones de disolventes orgánicos o en presencia de concentraciones saturadas de guanidina-HCl, fueron lavadas con tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7, filtradas a vacío y resuspendidas en el tampón, pH y temperatura indicada, en una relación 1/10 (p/v). Se midió actividad enzimática a diferentes tiempos. Cuando se alcanzó un valor constante de actividad, éste se consideró el valor máximo de actividad recuperado. En algunos casos, se realizaron varios ciclos consecutivos de inactivación-reactivación de la enzima inmovilizada.

4. 15. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE).

Las electroforesis de las diferentes enzimas se realizaron según la técnica descrita por (Laemmli, 1970). Las preparaciones proteicas, tanto en su forma soluble como en su forma inmovilizada, fueron hervidas durante 5 minutos en presencia de tampón de ruptura (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, 2 % de sodio-dodecil sulfato (SDS), 5 % de β -mercaptoetanol, 10 % de glicerol y 0,005 % de azul de bromofenol). Este tratamiento desorbe del soporte cualquier molécula de proteína no unida covalentemente al mismo. Los sobrenadantes de estas preparaciones enzimáticas así procesadas, fueron analizados por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) usando un equipo Mini-Protean 3 de Bio-Rad. Los geles usados fueron geles de poliacrilamida, con distinto porcentaje de poliacrilamida en la zona de separación (de 9 x 6 cm) en función del experimento: entre 8 % y 15 %. El porcentaje más comúnmente utilizado fue del 12 % si no se indica lo contrario en el experimento en concreto. El porcentaje de poliacrilamida en la zona de concentración fue de 5 %, en todos los casos. La separación se inició al aplicar 150V. Se utilizaron patrones de bajo peso molecular (14,4-97 kDa, GE Healthcare). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Neuhoff, 1988) para determinar las diferentes bandas proteicas separadas según su movilidad electroforética.

4. 16. ESTUDIOS DE LOCALIZACIÓN ESPACIAL DE BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS.

4. 16. 1. Marcaje de proteínas con sondas fluorescentes.

Soluciones enzimáticas fueron dializadas frente a una solución 0,1M de bicarbonato sódico a pH 9,5 y la concentración final de proteína después de la diálisis fue medida por el método de Bradford (la concentración fue entre 0,4-0,5 mg/mL) (Bolívar et al., 2011a). 10 mg/mL de una solución de fluorescamina isotiocianato (FITC) o rodamina B isotiocianato fue preparada en dimetil sulfóxido (DMSO). Las proteínas y las moléculas fluorescentes se mezclaron en proporción 1 mol de proteína/20 moles de molécula fluorescente. La mezcla se incubó a 25 °C, bajo agitación suave y protegido de la luz. Para retirar el exceso de sonda fluorescente, se añadió Q-sepharose a la solución (1 g soporte por cada 10 mL de disolución), y fue incubado durante 1 hora bajo agitación suave. Una vez, todas las proteínas marcadas fueron inmovilizadas al soporte, el sobrenadante fue descartado y la matriz sólida fue incubada con una solución de elución (25 mM de fosfato sódico pH 7 y 0,5 M NaCl). Bajo estas condiciones las proteínas marcadas fueron eluidas.

4. 16. 2. Microscopía laser confocal de barrido de proteínas marcadas con fluorescencia e inmovilizadas.

Cada muestra sólida después de la inmovilización fue resuspendida en el correspondiente tampón de inmovilización en una relación 1/10 (p/v). 30 µL de cada suspensión fueron analizadas por microscopía laser confocal de barrido (abreviatura en inglés CLSM) (Servicio de Microscopía Óptica y confocal, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal TCS SP5 de la marca Leica. Se utilizó el modo de exploración secuencial para evitar interferencias entre los canales. Todas las imágenes correspondieron a una sección confocal única. Las imágenes fueron procesadas con el software LAS AF Leica y Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.) (Bolívar et al., 2011a).

4. 16. 3. Localización espacial de los biocatalizadores inmovilizados.

La localización visual de los biocatalizadores inmovilizados (véase **Figura 5.51**) permitió calcular los diferentes parámetros relacionados con la localización de cada enzima involucrada en el sistema bio-redox C (Tt27-ADH2/Tt27-GDH) (véase **Tabla 6. 1**). El número de moléculas inmovilizadas de cada enzima por partícula de agarosa (j es por tanto la densidad de moléculas inmovilizadas por partícula de soporte) fue calculado de acuerdo a la ecuación (1) donde q es la cantidad de proteína inmovilizada por g de soporte sólido (mg/g), M_w es el peso molecular de la proteína, N_A es el número de

Avogadro y n_b es el número de partículas de soporte por gramo de soporte sólido húmedo (170731 partículas/g)

$$(1) \quad j = ((q/M_w) * N_A) / n_b$$

La distancia entre dos moléculas vecinas de la misma proteína fue calculada de acuerdo a la ecuación (2) previamente descrita por (Jokerst et al., 2011), donde r_o fue el radio ocupado por la proteína inmovilizada dentro de una partícula. Este radio fue determinado analizando las imágenes del CLSM con el software Image J.

$$(2) \quad d = \sqrt[3]{((4/3)\pi * r_o^3) / j}$$

(r_t): radio total de las partículas de agarosa medido con el software Image J.

(S_o): superficie ocupada por la proteína calculado en base a r_o .

(D): densidad de moléculas por superficie ocupada. $D = j / S_o$.

(d): distancia de separación entre dos moléculas de la misma enzima.

(j_{col}): número de moléculas de la enzima correspondiente que co-localizaron con su correspondiente socio dentro de una partícula [$j_{col} = j(n) * S_0(Tt27-GDH) / S_0(n)$; donde n es la enzima correspondiente].

(C): porcentaje de moléculas de Tt27-ADH2 que co-localizaron con todas las moléculas de Tt27-GDH inmovilizada.

4. 17. REACCIONES REDOX.

4. 17. 1. Resolución cinética de (*rac*)-1-feniletanol por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.

La oxidación de 1-feniletanol fue llevada a cabo utilizando un sistema de regeneración de NAD^+ formado por la Tt27-NOX y la Tt27-ADH1 inmovilizada en Ag-Glx (Rocha-Martin et al., 2009). La mezcla de reacción contenía 0,5 mM de NAD^+ , 10 mM de (*rac*)-1-feniletanol, 200 μ M FAD, en 10 mM de fosfato de sodio pH 7, con un volumen total de 10 mL. La reacción se realizó con 0,3 U de Tt27-ADH1 y 4 U de Tt27-NOX inmovilizadas en Ag-Glx a 25 °C y pH 7.

El curso de la reacción se siguió por HPLC (tomando muestras cada cierto tiempo) *vía* fase reversa (Spectra Physic SP100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP8450) utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0,4 cm) proporcionada por Análisis Vínicos (España), fase móvil 65:35 fosfato de sodio 10 mM /ACN a pH 7. El análisis se realizó a un flujo de 1 mL/min, a una absorbancia de 225 nm. El 1-feniletanol eluyó a los 4,4 min y la acetofenona a los 7,15 min. El exceso enantiomérico (*e.e.*) de los diferentes enantiómeros fue determinado por análisis en HPLC mediante columna quiral,

usando los enantiómeros puros comerciales para determinar la posición de cada uno de ellos. La columna quiral fue una Chiracel OD-R, fase móvil 65:35 fosfato de sodio 10 mM /ACN a pH 7. El análisis se realizó a un flujo de 0,5 mL/min, a una absorbancia de 225 nm. El enantiómero *R* eluyó a los 14,4 min mientras que el enantiómero *S* eluyó a los 16,4 min.

El exceso enantiomérico y el factor de asimetría se calcularon utilizando las siguientes fórmulas:

$$e. e. (\%) = \left[\frac{n (+) - n (-)}{n (+) + n (-)} \right] \times 100 \quad FA = \frac{n (+)}{n (-)}$$

donde n = enantiómero (mol)

En lo sucesivo, el número total de recambio por hora o frecuencia de recambio (TTN/h o TOF), se define como el número de moles de producto formado por mol de cofactor en una hora o en el tiempo que se indica (Van Der Donk and Zhao, 2003). Mientras que TTN, se define como el número total de recambio por ciclo de reacción.

4. 17. 2. Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH o Tt27-ADH2/Tt27-GDH.

La mezcla de la reacción contenía 0,5 mM de NADH, 10 mM de 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA) en 50 mM de tampón fosfato potásico 50mM, ácido fórmico 0,1M y 2 % de diglime a pH 7 y a la temperatura indicada (50°C o 37 °C) en un volumen final de 5 mL. La reacción se llevo a cabo con 4 U de Tt27-ADH2 y 8,3 U de Ps-FDH inmovilizadas en soporte indicado. Cuando es indicado, los biocatalizadores fueron separados del medio de reacción a las 3 y 24 horas filtrando a vacío la mezcla de reacción y tomando muestras a esos tiempos que luego fueron analizadas por HPLC.

En las reacciones llevadas a cabo con el sistema Tt27-ADH2/Tt27-GDH (denominado sistema C) co-inmovilizado o inmovilizado por separado para el estudio de la eficiencia oxidorreductora, la mezcla de reacción consistió en 10 mM de TFA en 50 mM fosfato potásico, 100 mM de ácido glutámico, 2 % de diglime (bis (2-metoxietil) o 2-propanol y la concentración de NADH que se indica en cada caso (0,0005; 0,005; 0,01; 0,05 y 0,2 mM) a pH 8 y 55 °C. El volumen final de la reacción fueron 5 mL y se añadieron diferentes proporciones de DH principal/DH regeneradora (1.4/2.7/4.9) como se indica en cada caso. La velocidad inicial de los sistemas bio-redox fue monitorizada mediante la medida de las velocidades de producción de los productos de la reacción.

El curso de la reacción se siguió por HPLC (tomando muestras cada cierto tiempo) *vía* fase reversa (Spectra Physic SP100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP8450) utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0,4 cm) proporcionada por Análisis Vínicos (España). El análisis se

realizó a un flujo de 1 mL/min, a una absorbancia de 260 nm. La TFA eluyó a los 6,8 min mientras que el alcohol eluyó a los 14,2 min. El *e.e.* de los diferentes enantiómeros fue determinado por análisis en HPLC mediante columna quiral, usando los enantiómeros puros comerciales para determinar la posición de cada uno de ellos. La columna quiral fue una Chiracel OD-R, fase móvil 65:35 H₂O miliQ/ACN. El análisis se realizó a un flujo de 0,5 mL/min, a una absorbancia de 260 nm. El enantiómero *R* eluyó a los 32,3 min mientras que el enantiómero *S* eluyó a los 27,1 min.

4. 17. 3. Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal por el sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH y Gox-GyDH/Ps-FDH.

La reacción enzimática del sistema bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH NAD⁺ dependiente se realizó en 0,1 M de fosfato de sodio y 0,1 M de ácido fórmico a la temperatura y pH indicado bajo agitación suave. La mezcla de la reacción contenía 0,25 mL de una disolución 20 mM de 2-fenilpropionaldehído en acetonitrilo (ACN) (concentración final del sustrato 1 mM) y 0,1 mM de NADH en un volumen final de 5 mL o 10 mL. La reacción se llevo a cabo con 2 U de Tt27-ADH2 y 4 U de Ps-FDH inmovilizadas en el soporte indicado. Cuando se indica, la reacción se realizó en presencia de disolventes orgánicos, acetonitrilo (ACN) o tetrahidrofurano (THF), en una concentración dada (de 0 a 15 % del volumen total).

En las reacciones llevadas a cabo con los sistemas co-inmovilizados o inmovilizados por separado para el estudio de la eficiencia oxidorreductora, la reacción del sistema Gox-GyDH/Ps-FDH dependiente de NADP⁺ (denominado sistema A) se realizó en 0,1 M de fosfato de sodio y 0,1 M de ácido fórmico a 30 °C y pH 7 bajo agitación suave. La mezcla de la reacción contenía 0,25 mL de una disolución 20 mM de (*rac*)-2-fenilpropanal en acetonitrilo (ACN) (concentración final del sustrato 1 mM) y la concentración de NADPH indicada (0,0005; 0,005; 0,01; 0,05 y 0,2 mM) en un volumen final de 5 mL. La reacción se llevó a cabo con 0,57 U de Gox-GyDH y 1 U de Ps-FDH. La velocidad inicial de los sistemas bio-redox fue monitorizada mediante la medida de las velocidades de producción de los productos de la reacción.

El curso de la reacción se siguió por HPLC (tomando muestras cada cierto tiempo) *vía* fase reversa (Spectra Physic SP100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP8450) utilizando una columna Kromasil C18 (15 cm x 0,4 cm) proporcionada por Análisis Vínicos (España). El *e.e.* de los diferentes enantiómeros fue determinado por análisis en HPLC mediante columna quiral, usando los enantiómeros puros comerciales para determinar la posición de cada uno de ellos. La columna quiral fue una Chiralpal AD-H, fase móvil 100:1 hexano/isopropanol. El análisis se realizó a un flujo de 0,5 mL/min, a una absorbancia de 215 nm. El enantiómero *R* eluyó a los 53,5 min mientras que el enantiómero *S* eluyó a los 47,3 min.

4. 17. 4. Oxidación selectiva de glicerol a dihidroxiacetona por el sistema bi-enzimático Cb-GyDH/Tt27-NOX.

La mezcla de la reacción contenía 0,1 M de glicerol en 25 mM de fosfato sódico pH 7 y la concentración de NADPH indicada (0,0005; 0,005; 0,01; 0,05 y 0,2 mM). 5 mL de la mezcla de reacción fueron incubados junto a 0,184 U de Tt27-NOX y 0,253 Cb-GyDH (denominado sistema B) a 25 °C inmovilizadas en el soporte adecuado. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y la cantidad de DHA producida se determinó espectrofotométricamente mediante un ensayo indirecto que consistió en una solución de 1 % de difenilamina (p/v) en 10% (v/v) de ácido sulfúrico y 90 % (v/v) de ácido acético (Chen and Zhou, 2008). El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos mediante la adición de 225 µL de la solución de difenilamina y 25 µL de muestra. El incremento en la absorbancia a 615 nm se comparó con una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de DHA (de 0,05 a 0,3 mg/mL). La velocidad inicial de los sistemas bio-redox fue monitorizada mediante la medida de las velocidades de producción de los productos de la reacción.

4. 18. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.

4. 18. 1. Estudios de dinámica molecular.

Estos estudios fueron llevados a cabo en colaboración con el Dr. Aurelio Hidalgo (CBMSO, UAM-CSIC). Los modelos estructurales de las distintas variantes de Tt27-NOX fueron preparados mediante sustitución de los aminoácidos correspondientes sobre la estructura de la Tt27-NOX (código PDB: **1nox**) y posterior minimización *in vacuo* utilizando el campo de fuerzas Nova (Krieger et al., 2002) en el programa YASARA Structure (Yasara Biosciences). Las simulaciones de dinámica molecular (DM) se realizaron sobre los modelos estructurales en agua como disolvente explícito, durante 10 ns a 298K utilizando el campo de fuerzas Yamber3 (Krieger et al., 2004). Durante el transcurso de la simulación de DM, se tomaron *snapshots* a intervalos de 500 ps, analizando la evolución del RMSD (desviación cuadrática media de las diferencias entre posiciones) y RMSF (desviación cuadrática media de las fluctuaciones entre posiciones) por residuos, así como la energía y RMSD totales del sistema. Las simulaciones se repitieron 3 veces para asegurar la consistencia de los resultados.

4. 18. 2. Estudios de docking.

Los estudios de docking de Tt27-NOX fueron llevados a cabo en colaboración con el Dr. Aurelio Hidalgo (CBMSO, UAM-CSIC). Se realizaron estudios de docking del FAD sobre los modelos estructurales KRY y KHY de las variantes de Tt27-NOX mediante una versión de AutoDock 4 (Morris et al., 1998) plenamente integrada en YASARA. El receptor y los ligandos fueron preparados en YASARA

Material es y métodos

Structure (Yasara Biosciences) Para ello se tomó la estructura del FAD de la base de datos PDB (código: FAD) para utilizar como ligando. Para limitar el docking sobre la región del centro activo, se definió una caja de 15 Å centrada en el residuo FMN300 de la cadena β. Se realizaron 25 experimentos de docking, y se consideraron soluciones diferentes aquellas cuyo RMSD fuera menor 1Å. Se obtuvieron 25 soluciones diferentes, es decir, no se observó convergencia, probablemente debido a que la cavidad del centro activo está muy abierta al medio, lo que posibilita prácticamente cualquier orientación del sustrato. Las figuras fueron creadas con Pymol 0.99 (DeLano, USA).

Los estudios de docking de la TFA y (2*R*)-2-fenilpropanal en la estructura 3D de la Tt27-ADH1 y Tt27-ADH2 se llevaron a cabo utilizando las estructuras cristalinas disponibles en el Protein Data Bank (PDB: 1uay) de *Thermus thermophilus* HB8. El análisis de docking fue llevado a cabo utilizando el servidor SwissDock (<http://www.swissdock.ch/>) en (2*R*)-2-fenilpropanal en modo preciso. Los resultados de las diferentes conformaciones para cada sustrato fueron analizadas utilizando el software USFC Chimera 1.5.3 (Pettersen et al., 2004). La conformación de mínima energía de acoplamiento de TFA y (2*R*)-2-fenilpropanal dentro del centro activo de la Tt27-ADH2. Las figuras fueron creadas con Pymol 0.99 (DeLano, USA) utilizando el pdb obtenido de los cálculos del SwissDock.

Para analizar las secuencias de DNA se utilizaron bases de datos disponibles en los siguientes servidores:

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html> (European Bioinformatics Institute).

<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html> (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

<http://bacmap.wishartlab.com> (BacMap Genome Atlas).

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Basic Logical Alignment Search Tool).

Y los programas: Gene Runner v3.05 y Chromas v1.45.

Las estructuras cristalinas de las proteínas se obtuvieron del Protein Data Bank (PDB): <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.



Resultados

5. RESULTADOS.

5. 1. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN Y REACTIVACIÓN DE UNA ALCOHOL DESHIDROGENASA RECOMBINANTE DE *Thermus thermophilus* HB27 (Tt27-ADH2).

En la química moderna, las ADHs tienen un papel importante debido a su versatilidad en reacciones redox. Estas enzimas son capaces realizar oxidaciones y reducciones, desde resoluciones cinéticas a reducciones asimétricas entre otras reacciones. Además, es frecuente que presenten una buena enantioselectividad lo que hace que puedan ser excelentes catalizadores en la industria farmacéutica porque facilitan la síntesis de compuestos de alto valor y fármacos ópticamente puros bajo condiciones “verdes” (Kroutil et al., 2004).

A continuación, se presentan los resultados más relevantes obtenidos del el aislamiento, purificación, caracterización, inmovilización-estabilización y reactivación de una nueva versátil y altamente selectiva ADH de *T. thermophilus* HB27.

5. 1. 1. Clonaje y expresión en *E. coli* de la enzima Tt27-ADH2.

El gen TTC0331 fue amplificado del ADN genómico de *Thermus thermophilus* HB27. Este gen, en la anotación del genoma secuenciado de dicho organismo, codifica una enzima perteneciente a la familia de las deshidrogenasas de cadena corta (SDRs). La proteína codificada por este gen, y nombrada de aquí en adelante como Tt27-ADH2, es un 99 % homóloga a una alcohol deshidrogenasa de la cepa HB8 de *T. thermophilus* que aunque había sido previamente cristalizada (código PDB: **1uay**), nunca había sido caracterizada. Además, esta enzima presenta un 35 % de homología con la alcohol deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH1) descrita previamente (Pennacchio et al., 2008).

Estos valores de homología fueron similares respecto otras SDRs de origen mesófilo como la ADH de *Lactobacillus brevis* (Lb-RADH) (29 %), de *Leifsonia* sp. cepa S749 (Ls-ADH) (37 %) y la 1-feniletanol deshidrogenasa de la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. cepa EbN1 (DB-SADH) (24 %) (Inoue et al., 2005a; Kniemeyer and Heider, 2001; Niefind et al., 2003; Pennacchio et al., 2008; Weckbecker and Hummel, 2006).

En la **Figura 5. 1** se puede observar el alineamiento de secuencias de diferentes SDRs de origen mesófilo y termófilo. La Tt27-ADH2 contiene los cuatro residuos catalíticos conservados por la familia de las SDRs como también el motivo rico en glicinas (G) involucrado en la unión de la coenzima.

Resultados

Por tanto, debido a la potencial actividad catalítica de la proteína Tt27-ADH2, codificada por el gen TTC0331, éste fue clonada en el vector de expresión pET-22b(+) para su posterior expresión heteróloga en *E. coli* BL21 (DE3).

```

Tt27-ADH2      M-----ERSALVTGGASGLGRAALALKARGYRVVLDLRRG-GED---
Tt27-ADH1      MGL--FAGKGVLVTTGGARGIGRAIAQAFAREGALVALCDLRPE-GKEVA-
LS-ADH         MAQYDVADRSIAIVTGGGSGIGRAVALTLAASGAVALVTDLNEEHAQAVVA
Lb-RADH        SNR--LDGKVAIITGGTLGIGLAIAATKFVEEGAKVMTGRHSDVGEKAA-
DB-SADH        MTQR-LKDKLAVITGGANGIGRAIAERFAVEGADIAIADLVPA-PEAE-A
                :.::***  *:* * * : * : : .

Tt27-ADH2      -----LIYVEGDVTREEDVRR-AVARAQEEAPLFAVVSAGVGLA
Tt27-ADH1      --EAIGG---AFFQVDLEDERERVRVVEEAYALGRVDVLVNNAAIAAP
LS-ADH         EIEAAGG--KAAALAGDVTDPAFG-EASVAGANALAPLKIAVNNAGIGGE
Lb-RADH        --KSVGTPDQIQFFQHDSSDEGWTCLFDATEKAFGPVSTLVNNAGIAVN
DB-SADH        AIRNLGR--RVLTVKCDVSQPGDVEAFGKQVISTFGRCDILVNNAGIYPL
                . * . * .

Tt27-ADH2      EKILGKEGPHGLESFRRVLEVNLLGTFNVLRLAAMRENPPDAEGQRG-
Tt27-ADH1      -G---SALTVRLPEWRRVLEVNLTAPMHLAALAREMRKV-----GGG-
LS-ADH         AA---TVGDYSLDSWRTVIEVNLNAVYFGMQPQLKAMAAN-----GGG-
Lb-RADH        -K---SVEETTTAEWRKLLAVLDGVFFGTRLGQRMKNK-----GLGA
DB-SADH        -I---PFDELTFEQWKTTFEINVDSGFLMAKAFVPMKRN-----GWG-
                .: : : * : . *

Tt27-ADH2      VIVNTASVAAFEGQIGQAAAYAAKSGGVVALTLPAARELA--GWGIRVVTV
Tt27-ADH1      AIVNVASVQGLFAEQENAAAYNASKGGLVNLTRSLALDLA--PLRIRVNAV
LS-ADH         AIVNMASILGSVGFANSSAYVTAKHALLGLTQNAALEYA--ADKVRVNAV
Lb-RADH        SIINMSSIEGFVGDPSLGAYNASKGAVRIMSKSAALDCALKDYDVRVNTV
DB-SADH        RIINLTSTTYWLKIEAYTHYISTKAANIGFTRALASDLG--KDGITVNAI
                *:* : * : * : . : * : . : * :

Tt27-ADH2      APGLFDTPLL-QGLP-EK----AKASLAAQVFFPRLGRPEEYAAALVLHV
Tt27-ADH1      APGAIAATEAVLEAIALSPDPERTRRDWED-LHALRLGKPEEVAEAVLFL
LS-ADH         GPGFIRTPLV-EANL-SAD---ALAFLEG-KHALGRLGEPEEASLVAFLL
Lb-RADH        HPGYIKTPLV-DDLP-GAE---EAMSQRT-KTPMSHIGEPNDIAYICVYL
DB-SADH        APSLVRTATT-EASALSAM---FDVLPN-MLQAIPRLQVPLDLTGAAAFLL
                * . . * : : : * : : . :

Tt27-ADH2      L--ENPMLNGEVIRLDGALRMA-----PR
Tt27-ADH1      ASEKASFITGAILPVDGGMTASFMAGRPV
LS-ADH         ASDAASFITGSYHLVDGGYTA-----Q
Lb-RADH        ASNESKFATGSEFVVDGGYTA-----Q
DB-SADH        ASDDASFITGQTLAVDGGMVR-----H
                : . * : **

```

Figura 5. 1. Alineamiento de secuencias de diferentes alcoholes deshidrogenasas pertenecientes a la familia de las SDRs. Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo ClustalW. Los residuos marcados en negrita se corresponden con los residuos involucrados en la unión de coenzima redox. Los residuos conservados aparecen marcados en rojo (N101, S135, Y148 and K152) y son la tétrada catalítica. Los residuos D bien conservados que definen la especificidad por el NAD(H) de las SDRs están marcados con un recuadro rojo.

5. 1. 2. Purificación de la Tt27-ADH2.

La purificación se llevó a cabo aprovechando la ventaja que ofrece la naturaleza termófila de esta proteína. Mediante la aplicación de un tratamiento térmico pudimos generar agregados proteicos, formados en su mayor parte por proteínas de *E.coli*, que pueden ser eliminados por medio de una centrifugación (Bolívar et al., 2008; Rocha-Martin et al., 2009). Primero se estudió la estabilidad de la enzima soluble a 70 °C y pH 7, para poder aplicar el tratamiento térmico más adecuado en el proceso de purificación. Se comprobó que la enzima conservaba el 100% de la actividad tras 70 minutos de incubación. La aplicación del tratamiento térmico permitió alcanzar un alto factor de purificación (próximo a 10) como se había observado en otros trabajos anteriores (Bolívar et al., 2008; Rocha-Martin et al., 2009). Después del tratamiento térmico, se aumentó el factor de purificación mediante la

incubación de las proteínas termorresistentes junto a agarosa activada con grupos quelatos metálicos. Estos tipos de soportes cromatográficos de afinidad se han descrito como que son capaces de unir gran cantidad de las proteínas presentes en el extracto crudo de *E.coli* (hasta más de un 90 % de las proteínas presentes en el extracto proteico pueden adsorberse sobre soportes con un alto grado de activación)(Armisen et al., 1999). La aplicación de este segundo paso de purificación supuso una importante mejora del factor de purificación, ya que la Tt27-ADH2 no se unió al soporte IMAC.

Por tanto, esta proteína de origen termófilo expresada en *E. coli* se purificó mediante un primer paso donde el extracto crudo proteico fue sometido a un tratamiento térmico a 70°C durante 60 minutos, alcanzando un factor de purificación de 10 con casi un 100 % de rendimiento (**Tabla 5. 1**). Tras esta incubación, se centrifugó la mezcla obteniéndose un sobrenadante que se incubó en presencia del soporte IMAC (Ag-IDA-Cu²⁺) durante 60 minutos, donde la mayor parte de la proteína de interés permaneció en el sobrenadante y el resto de proteínas del hospedador que no precipitaron durante el tratamiento térmico (alrededor de un 5-10 %) se unieron al soporte mejorando el factor de purificación hasta alcanzar un valor de 23. Finalmente, el sobrenadante fue filtrado y analizado por SDS-PAGE de acuerdo con (Laemmli, 1970) (**Figura 5. 2**).

	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento purificación (%)
Extracto crudo	22,9	0,19	1	100
Tratamiento térmico (70°C 60 min.)	2,3	2,49	9,9	99
Tratamiento térmico (70°C 60min.) + Ag- IDA-Cu ²⁺ 60 min.	0,9	4,25	23,6	81

Tabla 5. 1. Purificación de la Tt27-ADH2. Actividad específica a 65 °C y pH 7 con (rac)-1-feniletanol como sustrato y 2,5 mM de NAD⁺.

La aparente movilidad electroforética de esta enzima (27 kDa), que puede observarse en el carril 4 de la **Figura 5. 2**, concuerda con el tamaño esperado del gen TTC0331 (26,6 kDa) y similar a otras proteínas de la familia de las SDRs (Okamoto et al., 2011; Pennacchio et al., 2010a; Rocha-Martin et al., 2009).

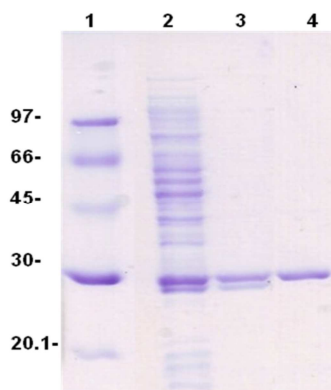


Figura 5. 2. Análisis SDS-PAGE del proceso de purificación de la Tt27-ADH2. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (kDa); 2) Extracto crudo; 3) Sobrenadante tras tratamiento térmico a 70 °C durante 1 hora; 4) Sobrenadante después de la incubación en presencia del soporte Ag-IDA-Cu⁺² durante 1 hora.

5. 1. 3. Caracterización bioquímica de la Tt27-ADH2.

5. 1. 3. 1. Especificidad de sustrato.

La Tt27-ADH2 mostró actividad oxidoreductasa tanto usando el cofactor NAD(H) como el NADP(H), aunque ésta fue 6,6 veces más activa con NAD(H). En este contexto, la actividad redox fue analizada hacia múltiples cetonas, aldehídos, cetoésteres y alcoholes utilizando NAD(H) como cofactor (**Tabla 5. 2**). Esta enzima presentó mayor actividad para la reducción que para la oxidación a pH 7 y 65 °C (condiciones de medida de la actividad enzimática). Bajo estas condiciones, la Tt27-ADH2 mostró mayor actividad catalítica hacia la reducción de cetonas arílicas halogenadas como la 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA), mientras que la actividad frente la acetofenona fue muy baja. Las cetonas cíclicas no halogenadas, como la ciclohexanona, fueron también reducidas eficientemente (**Tabla 5. 2**). Además, esta enzima también fue capaz de reducir eficientemente aldehídos como el 2-fenilpropanal.

Por otro lado, la actividad oxidativa de la Tt27-ADH2 fue más baja que la actividad reductiva como se mencionó anteriormente. Esta enzima no mostró actividad frente a alcoholes primarios y/o alifáticos mientras que la mejor actividad oxidativa (solo un 16% con respecto a la mejor actividad reductiva) fue hacia un alcohol secundario cíclico (**Tabla 5. 2**). Fue sorprendente que la enzima no fuera capaz de oxidar el alcohol α -(trifluorometil)bencílico aunque redujera eficientemente su cetona correspondiente. Por el contrario, el 1-feniletanol fue oxidado aunque a una baja tasa, similar a lo que ocurre en la Tt27-ADH1 (Pennacchio et al., 2008). En el caso del 1-feniletanol, la enzima no fue selectiva, porque oxidó por igual ambos enantiómeros, a diferencia de otras SDRs que son muy enantioselectivas para cada sustrato (Inoue et al., 2005b; Niefind et al., 2003; Pennacchio et al., 2008; Weckbecker and Hummel, 2006).

Sustrato	Actividad específica (U/mg)	Actividad relativa (%)
Cetonas		
Ciclohexanona	8,2	9,5
2-metilciclohexanona	24,8	28,9
Acetofenona	0,2	0,3
2,2', 2''-trifluoroacetofenona	85,7	100,0
3', 5'-bis(trifluorometil)acetofenona	0,85	1,0
Aldehídos		
(rac)-2-fenilpropanal	10	11,7
Alcoholes		
Trifluoroetanol	0	0,0
Etanol	0	0,0
(rac)-1-feniletanol	3,8	4,4
(S)-(-)-1-feniletanol	4,5	5,3
(R)-(+)-1-feniletanol	1,4	1,7
Ciclohexanol	2,2	2,6
Trans-2-metilciclohexanol	2	2,3
Cis-2-metilciclohexanol	13,7	16,0
(S)-(+)- α -(trifluorometil)benzil alcohol	0	0,0
(R)-(-)- α -(trifluorometil)benzil alcohol	0	0,0
(rac)-2-fenil-1-propanol	0	0,0
β-hidroxi ésteres		
Etil-(rac)-3-hidroxibutirato	0,9	1,1
Etil-(S)-(+)-3-hidroxibutirato	2,3	2,7
Etil-(R)-(-)-3-hidroxibutirato	0,2	0,3

Tabla 5. 2. Especificidad de sustrato de la Tt27-ADH2. Actividad específica determinada a 65 °C y pH 7 con la enzima soluble purificada. La concentración de sustrato fue 25 mM para alcoholes y 1 mM para cetonas, aldehídos y β -hidroxi ésteres. La concentración de NAD^+ en los ensayos de oxidación fue de 5 mM y 0,25 mM de NADH en las reacciones de reducción. Cuando fue necesario el sustrato fue disuelto en 50 % de 2-propanol. El % de disolvente en el volumen total de reacción no sobrepasó el 2 %. Se tomó como 100 % la actividad medida hacia la 2,2', 2''-trifluoroacetofenona.

Finalmente, la enzima también fue capaz de oxidar β -hidroxi ésteres alifáticos pero apenas redujo α -cetoésteres y α -cetoácidos.

5. 1. 3. 2. Parámetros cinéticos.

Los parámetros cinéticos de esta enzima (**Tabla 5. 3**) fueron calculados ajustando los valores de actividad a una regresión no lineal de acuerdo con la ecuación de Michaelis Menten (véase **Métodos**). Esta enzima fue mucho más eficiente catalíticamente en el sentido de la reducción que en el sentido de la oxidación en condiciones de pH neutro. Esta preferencia significa que la Tt27-ADH2 tuvo cerca de 10 veces más afinidad por el NADH que por el NAD^+ , con una k_{cat} 20 veces mayor para el primero que para el segundo.

La enzima también fue capaz de utilizar NADPH como cofactor pero con una afinidad 6,6 veces menor que la afinidad mostrada por el NADH.

Resultados

	K_m (mM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m (s ⁻¹ *M ⁻¹)*10 ³
TFA ^a	0.58±0.08	39±2	67.2
1-feniletanol ^b	22.6±2.3	1.7±0.2	0.075
NADH ^c	0.011±0.003	39±2	3391
NAD ⁺ ^d	0.12±0.05	1.7±0.2	13.8

Tabla 5. 3. Parámetros cinéticos de la Tt27-ADH2 calculados a pH 7 y 65 °C. ^a Parámetros cinéticos calculados utilizando 0,25 mM de NADH como cofactor. ^b Parámetros cinéticos calculados utilizando 2,5 mM de NAD⁺ como cofactor. ^c Parámetros cinéticos fueron calculados utilizando 10 mM de TFA como sustrato. ^d Parámetros cinéticos calculados utilizando 25 mM de (rac)-1-feniletanol como sustrato.

5. 1. 3. 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la Tt27-ADH2 soluble.

Un parámetro importante para evaluar el potencial biotecnológico de una enzima es la actividad frente a la temperatura, porque en ocasiones las condiciones operacionales son muy distintas de las fisiológicas. La temperatura óptima fue de 85 °C, como puede observarse en la **Figura 5. 3**. Por otra parte, la actividad específica de esta enzima frente a la TFA a temperatura moderadamente baja (por ejemplo, 30 °C) fue de 7,5 U/mg, valor el cuál es considerablemente alto tratándose de una enzima de naturaleza termófila (Inoue et al., 2005a).

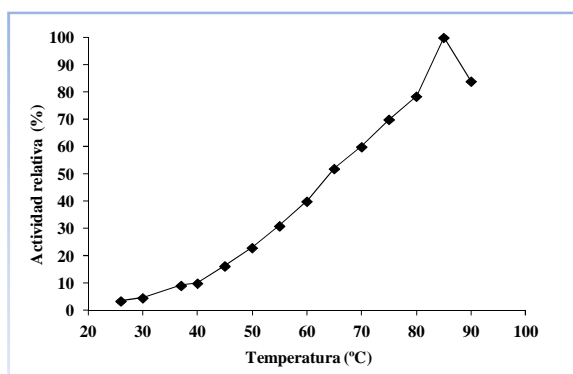


Figura 5. 3. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la Tt27-ADH2. Actividad medida con 25 mM de (rac)-1 feniletanol en 50 mM fosfato de sodio pH 7 y 5 mM de NAD⁺.

5. 1. 3. 4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-ADH2 soluble.

Otro parámetro importante para evaluar el potencial biotecnológico de una enzima es la actividad frente al pH. Se estudió el pH tanto en reacciones de oxidación como de reducción.

Esta enzima mostró un perfil actividad-pH similar para ambas reacciones (véase **Figura 5. 4**), siendo el pH 7 el óptimo tanto para la oxidación como para la reducción.

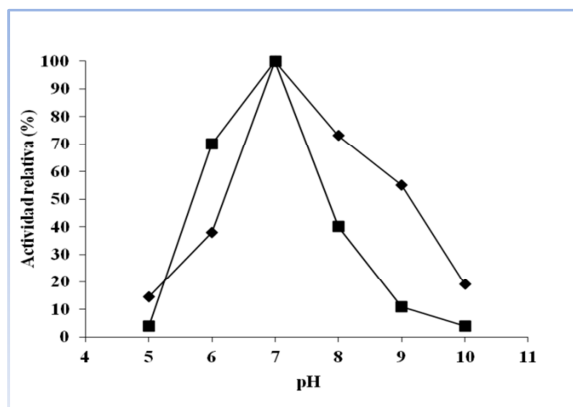


Figura 5. 4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-ADH2. Símbolos: (◆) reacción de oxidación utilizando como sustrato 25 mM de 1-feniletanol; (■) reacción de reducción utilizando como sustrato 10 mM de acetofenona. Actividad medida a 65 °C. Tampones 50 mM utilizados: acetato de sodio pH 5, fosfato de sodio pH 6 y pH 7, borato de sodio pH 9 y bicarbonato de sodio pH 10.

5. 1. 4. Inmovilización y estabilización de la Tt27-ADH2.

En esencia, la inmovilización de enzimas permite una fácil separación del medio de reacción y reutilización del biocatalizador. De este modo, la recuperación del producto es mucho más fácil y muy a menudo, si es propiamente diseñada, mejora la resistencia a la inactivación de las enzimas frente a diferentes agentes desnaturizante (incluyendo pH extremo, altas temperaturas, presencia de disolventes orgánicos, etc.). Por tanto, la inmovilización de enzimas podría incrementar la estabilidad operacional del biocatalizador (Mateo et al., 2006). Sin embargo, las técnicas de inmovilización pueden afectar positiva o negativamente a la estabilidad térmica y a la actividad catalítica. La obtención de un catalizador mediante inmovilización, con adecuadas propiedades de actividad y estabilidad, requiere un cuidadoso diseño y análisis de las diferentes estrategias de inmovilización. Por esa razón, se preparó una batería de derivados con el fin de encontrar el protocolo de inmovilización óptimo que promoviera la mayor estabilización y que afectara lo menos posible a la actividad catalítica de la enzima.

5. 1. 4. 1. Inmovilización de la Tt27-ADH2 mediante diferentes estrategias.

Las diferentes estrategias de inmovilización, que incluyeron tanto soportes comerciales como preparados en el laboratorio (véase **Introducción y Métodos**), estudiadas fueron:

- Inmovilización en intercambiadores aniónicos (inmovilización reversible): agarosa dietilaminoetil (DEAE Sepharose®), agarosa monoamino-N-aminoetil (Ag-MANAE), agarosa polietilenimina (Ag-PEI) y Q- Sepharose®.
- Inmovilización en intercambiadores catiónicos (inmovilización reversible): inmovilización en agarosa dextrano sulfato (Ag-DS), Carboximetil Sepharose® y Sulfopropil Sepharose®.
- Inmovilización en soportes cromatográficos de afinidad Cu^{2+} (Ag-IDA- Cu^{+2}) (inmovilización reversible).
- Inmovilización mediante unión covalente (BrCN Sepharose® y Ag-Glx) (inmovilización irreversible).

Resultados

De este modo, se promovió la inmovilización de la enzima a través de diferentes regiones, como por ejemplo: a través de la región más rica en residuos Lys en agarosa activada con grupos glioxi, a través del extremo amino terminal en agarosa activada con bromuro de cianógeno, a través de la región con mayor densidad de cargas positivas y negativas en agarosa recubierta con polímeros de dextrano sulfato y polietilenimina respectivamente.

De entre todas estas estrategias de inmovilización, los mejores resultados obtenidos, en cuanto a rendimiento de inmovilización y actividad expresada, fueron las inmovilizaciones llevadas a cabo en BrCN Sepharose®, Ag-Glx, DEAE Sepharose®, Ag-PEI 25 kDa, Ag-MANAE y Ag-DS (véase **Tabla 5. 4**). Los peores resultados se obtuvieron con los soportes Carboximetil Sepharose®, Q- Sepharose®, Sulfopropil Sepharose® en los cuales no se logró recuperar actividad enzimática. Dependiendo del protocolo de inmovilización el rendimiento de inmovilización y la actividad expresada varió como puede observarse en la **Tabla 5. 4**.

Soporte	Rendimiento inmovilización (%) ^a	Actividad expresada (%) ^b
BrCN Sepharose®	100	46
Ag-Glx pH10	100	70
DEAE Sepharose®	48	46
Ag-PEI 25kDa	78	47,5
Ag-DS	57,7	70
Ag-MANAE 40 µM/mL	52	99

Tabla 5. 4. Inmovilización de la Tt27-ADH2 sobre diferentes soportes. ^a Rendimiento inmovilización = (actividad inmovilizada/actividad blanco) x100. ^b Actividad relativa expresada = (actividad expresada/ actividad inmovilizada) x 100.

5. 1. 4. 2. Estabilidad térmica de la Tt27-ADH2 inmovilizada.

Cuando los derivados fueron térmicamente inactivados mediante la incubación a 80 °C y pH 7 (**Figura 5. 5**), la mayor estabilización fue alcanzada cuando la Tt27-ADH2 fue inmovilizada en Ag-Glx bajo condiciones alcalinas (el tiempo de vida media del catalizador fue de 90 horas), donde la unión enzima-soporte fue mediante enlaces covalentes multipuntuales.

Por el contrario, la inmovilización en BrCN Sepharose® fue sólo 2 veces más estable que la enzima soluble y su vida media fue de 5,5 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. En este caso, sería probable que la enzima se uniera covalentemente al soporte por el extremo amino terminal de la enzima.

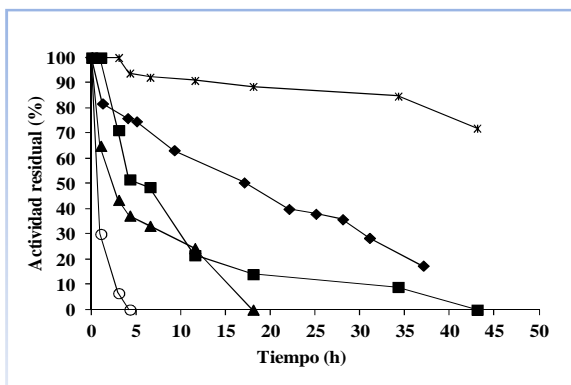


Figura 5.5. Curso de inactivación a pH 7 y 80°C de la Tt27-ADH2 inmovilizada. Símbolos: (♦) Tt27-ADH2 soluble; (■) BrCN Sepharose®-(Tt27-ADH2); (○) Ag-DS-(Tt27-ADH2); (*) Ag-Glx-(Tt27-ADH2); (▲) Ag-PEI 25 kDa-(Tt27-ADH2). Actividad medida a 65 °C con 25 mM de 1-feniletanol en 50 mM fosfato de sodio pH 7 y 5 mM de NAD⁺.

Con respecto a la inmovilización reversible, los soportes iónicos desestabilizaron la Tt27-ADH2 ya que los derivados Ag-MANAE, DEAE Sepharose®, Ag-DS, Ag-PEI fueron menos estables que la enzima soluble. Por lo tanto, el soporte que ofrece unas mejores perspectivas de estabilización fue el Ag-Glx, que promovió el mayor factor de estabilización (16 veces), y por esta razón se llevó a cabo la optimización de dicho derivado.

5. 1. 4. 3. Optimización de la inmovilización de Tt27-ADH2 en Ag-Glx.

Existen numerosas variables que pueden afectar al proceso de inmovilización con el fin de alcanzar los derivados óptimos en términos de estabilidad. Así, el tiempo de incubación bajo condiciones de pH alcalino ha jugado un papel muy importante en la estabilidad final de los derivados inmovilizados en soportes Ag-Glx (Pedroche et al., 2007). De este modo, la Tt27-ADH2 fue inmovilizada a pH 10 en Ag-Glx e incubada bajo el mismo pH durante diferentes periodos de tiempo para hacer más o menos intensa la unión covalente multipuntual enzima-soporte. La estabilidad de los derivados resultantes fue estudiada en condiciones ligeramente más drásticas que las anteriores, 80 °C y pH 5, para evaluar su estabilidad en un periodo de tiempo más corto (**Figura 5. 6**). La inmovilización covalente de la Tt27-ADH2 en Ag-Glx después de 6 horas de incubación bajo condiciones de pH alcalino permitió obtener un biocatalizador cuyo tiempo de vida media a pH 5 y 80 °C fue de 75 horas, lo que significó que la enzima inmovilizada fue 200 veces más estable que la enzima soluble.

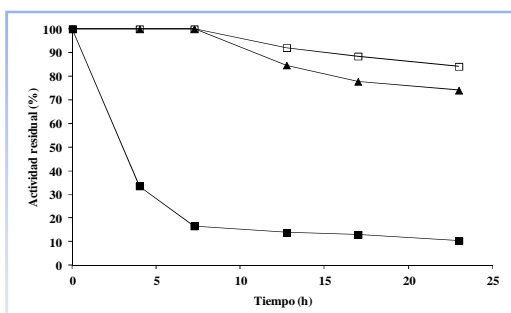


Figura 5.6. Curso de inactivación a pH 5 y 80°C de la Tt27-ADH2 inmovilizada. Símbolos: (■) BrCN Sepharose®-(Tt27-ADH2); (□) Ag-Glx-(Tt27-ADH2) incubada 6 h a pH 10; (▲) Ag-Glx-(Tt27-ADH2) incubada 20 h a pH 10. . Actividad medida a 65 °C con 25 mM de 1-feniletanol en 50 mM fosfato de sodio pH 7 y 5 mM de NAD⁺.

Resultados

Además, como la enzima es multimérica, se estudió si la inmovilización promovió la estabilización estructural mediante la inmovilización multisubunidades. Por lo cual, el derivado óptimo Ag-Glx-(Tt27-ADH2) fue tratado a 100 °C durante 5 minutos en presencia de SDS para posteriormente analizar una muestra del sobrenadante mediante SDS-PAGE. Mediante esta técnica podríamos detectar la presencia de monómeros en la muestra (con su correspondiente banda de proteína en la electroforesis), lo que sugeriría que alguno de los dos monómeros no está unido covalentemente al soporte. Como puede observarse en carril 3 de la **Figura 5. 8**, no aparece ninguna banda proteica lo que indica que las dos subunidades estaban unidas covalentemente al soporte.

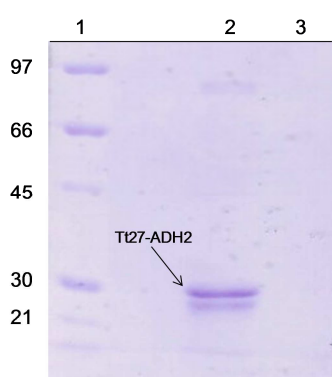


Figura 5. 8. Análisis SDS-PAGE de la estabilización de la estructura cuaternaria de la Tt27-ADH2. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (kDa); 2. Tt27-ADH2 libre posteriormente inmovilizada en Ag-Glx; 3. Sobrenadante del derivado Ag-Glx tras hervirlo a 100°C durante 5 min.

5. 1. 4. 4. Actividad y estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados de Tt27-ADH2 en presencia de disolventes orgánicos.

Debido a la baja solubilidad en medio acuoso de algunos de los sustratos estudiados, el uso de los catalizadores podría requerir la adición de disolvente orgánico para facilitar la disolución del sustrato en el medio de reacción. En muchos casos, la actividad enzimática puede verse afectada por la presencia de estos disolventes en el medio de reacción, así como la estabilidad de la enzima. Por ello, se estudió la actividad de la Tt27-ADH2 inmovilizada en Ag-MANAE, BrCN Sepharose® y Ag-Glx, en presencia de diferentes porcentajes de 2-propanol, dioxano y diglime para comprobar su comportamiento en estas condiciones.

De los 3 biocatalizadores inmovilizados estudiados, los peores resultados se obtuvieron con la enzima inmovilizada en Ag-MANAE, donde en el mejor de los casos, en presencia de un 20 % de diglime, el catalizador presentó un 40 % de actividad comparado con la actividad del mismo catalizador en medio totalmente acuoso. En el caso de la enzima inmovilizada en BrCN Sepharose® y Ag-Glx, su comportamiento fue similar, ya que en presencia de 20 % de diglime o dioxano, ambos biocatalizadores conservaron un 60 % de su actividad con respecto a la actividad de los derivados en medio totalmente acuoso.

En cuanto a la estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, se estudió la estabilidad de 3 biocatalizadores anteriormente mencionados en presencia de 50 % de diglime a pH 7 y 25°C. De nuevo, el peor resultado se obtuvo con la enzima inmovilizada en Ag-MANAE que conservó un 35 % de la actividad inicial tras 5 días de incubación. Los mejores resultados se obtuvieron con los derivados inmovilizados BrCN Sepharose® y Ag-Glx, que conservaron un 50 % y 60 % de la actividad inicial, respectivamente, tras 17 días de incubación.

5. 1. 5. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada.

5. 1. 5. 1. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada inactivada a altas concentraciones de agentes caotrópicos. Optimización de la reactivación.

En un reactor industrial, las enzimas se utilizan habitualmente en forma inmovilizada (Cao et al., 2003; Hartmeier, 1985; Katchalski-Katzir, 1993). En este sentido, si la enzima puede ser parcial o totalmente reactivada después de su inactivación, podría aumentar la vida media de funcionamiento del biocatalizador y, de esta manera, mejoraría la rentabilidad del proceso (Mozhaev et al., 1987). A primera vista, la reactivación de las enzimas inmovilizadas puede tener algunas ventajas en comparación con la reactivación de enzimas libres. Por ejemplo, las enzimas inmovilizadas no pueden agregar durante cualquier etapa de inactivación o reactivación (Goldberg, 1991). De hecho, en muchos casos las enzimas que poseen una cola de poliHis y que se producen como cuerpos de inclusión, son desplegadas y se promueve su repliegue mediante la inmovilización en soportes IMAC para así obtener moléculas de enzima activa (Jungbauer et al., 2004; Rogl et al., 1998; Wang et al., 2009). Por otra parte, si se alcanza una unión covalente multipuntual intensa entre la enzima y el soporte, no sólo la enzima sería más estable (Iyer and Ananthanarayan, 2008; Mateo et al., 2007a), también estos puntos, fijados a un soporte rígido, podrían actuar como puntos de referencia que ayudarían a alcanzar una mayor recuperación de la actividad de la enzima (Mozhaev et al., 1987; Rodrigues et al., 2009a; Romero et al., 2009; Soler et al., 1997).

Para estudiar la capacidad de reactivación del derivado Ag-Glx (mejor derivado con respecto a la estabilidad térmica) se procedió a su incubación en una disolución saturada de un agente caotrópico como es la guanidina. La guanidina es un fuerte caotrópico capaz de destruir interacciones no covalentes como los puentes de hidrógeno sin producir ningún tipo de modificación química en la estructura de la proteína (Lippincott and Apostol, 1999; Mukhopadhyay, 1997).

Además, para llevar a cabo una optimización de la reactivación se estudió la capacidad de reactivación a diferentes pHs (5, 7 y 9) y a diferentes temperaturas (25 °C, 45 °C y 65 °C) de la Tt27-ADH2 inmovilizada en Ag-Glx. Como se puede observar en la **Figura 5. 9**, a pH 7 la capacidad de reactivación no se vio influenciada por la temperatura de incubación del derivado. Independientemente de la temperatura, el biocatalizador Ag-Glx logró recuperar entorno al 90 % de la actividad inicial tras la incubación en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7 durante 2 horas, mientras que el biocatalizador BrCN

Resultados

Sepharose[®] sólo logró recuperar el 20 % de su actividad inicial tras casi 8 horas de incubación en las mismas condiciones de reactivación.

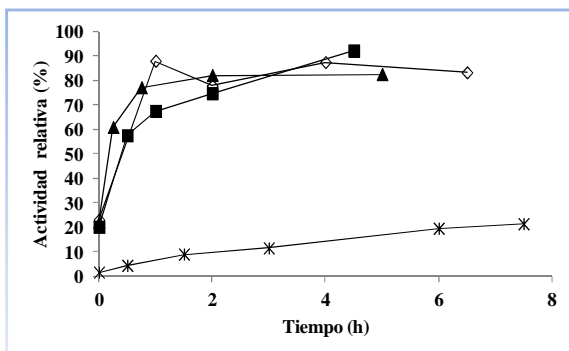


Figura 5. 9. Curso de reactivación a pH 7 de la Tt27-ADH2 inmovilizada tras una inactivación en presencia de guanidina 8 M pH 7. Símbolos: (*) BrCN Sepharose[®]-(Tt27-ADH2); (◇) Ag-Glx-(Tt27-ADH2) incubada a 65°C; (■) Ag-Glx-(Tt27-ADH2) incubada a 45°C; (▲) Ag-Glx-(Tt27-ADH2) incubada a 25°C. Reactivación llevada a cabo en tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7. Actividad medida a 65 °C con 25 mM de 1-feniletanol en 50 mM fosfato de sodio pH 7 y 5 mM de NAD⁺.

En los experimento de reactivación llevados a cabo a pH 5 y pH 9, los derivados Ag-Glx lograron recuperar cerca del 80 % de la actividad inicial tras 2 horas de incubación, independientemente de la temperatura de incubación al igual que ocurrió a pH 7.

5. 1. 5. 2. Reactivación de derivados inmovilizados de Tt27-ADH2 inactivados en altas concentraciones de disolventes.

El derivado Ag-Glx resultó ser el más estable y el que presentó una mayor capacidad de reactivación como mostraron los resultados anteriores. Así, este derivado fue sometido a la inactivación en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos (50% de dioxano), pH ácido (pH 5) y 37 °C. Tras 4 horas de incubación en estas condiciones, tanto el derivado BrCN Sepharose[®] como el Ag-Glx mostraron una actividad cercana al 0 %. Después de lavar los derivados e incubarlos en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 65°C (condiciones óptimas de reactivación como se mencionó en el apartado anterior), el derivado BrCN Sepharose[®] no logró recuperar una actividad apreciable, mientras que el derivado Ag-Glx logró recuperar cerca del 50 % de la actividad inicial tras 2 horas de incubación.

5. 2. PURIFICACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN DE UNA GLICEROL DESHIDROGENASA RECOMBINANTE DE *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH).

El glicerol formado como subproducto durante la producción de biodiesel puede ser utilizado como un compuesto químico de alto valor añadido como 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, ácido glicérico y dihidroxiacetona (DHA) (da Silva et al., 2009; Pagliaro et al., 2007; Zheng et al., 2008; Zhou et al., 2008). La DHA es uno de los compuestos químicos de alto valor añadido con un amplio rango de aplicaciones cosméticas (Levy, 1992), farmacéuticas (Suga et al., 2002) e industriales como precursor o *building block* C₃ en síntesis orgánica (Enders et al., 2005).

Para la producción de DHA a gran escala, hasta el momento se han utilizado biotransformaciones microbianas (con células) que son mucho más atractiva económicamente que los procesos químicos, y la mayoría de las investigaciones se han llevado a cabo en el ámbito de optimizar procesos de fermentación y modificación genética de las cepas productoras de DHA (Bauer et al., 2005; Hekmat et al., 2007; Li et al., 2010). Los inconvenientes de la oxidación microbiana de glicerol están relacionados con los largos tiempos de fermentación, alto consumo de energía en la esterilización, limitaciones debido al requerimiento de oxígeno, inhibición del crecimiento celular debido a las altas concentraciones de sustrato y productos (Bauer et al., 2005; Hekmat et al., 2007). Una alternativa sería emplear enzimas aisladas que poseen una alta selectividad y eficiencia. Debido al alto precio de las GyDH aisladas, éstas no han sido utilizadas en la producción de DHA y la inmovilización de estas GyDHs se hace imprescindible para facilitar la recuperación del biocatalizador y mejorar la estabilidad de la enzima.

La Cb-GyDH ha sido parcialmente caracterizada por Daniel y col. Se ha descrito como un hexámero de 246 kDa, cuyo monómero tiene un peso molecular de 43 kDa. La AE descrita es de 65,5 U/mg a pH 9 y 30 °C para la reacción de oxidación del glicerol a dihidroxiacetona y es una enzima dependiente de Mn²⁺ (Daniel et al., 1995).

5. 2. 1. Clonaje, expresión en *E. coli* y purificación de la Cb-GyDH.

El gen que codifica para la glicerol deshidrogenasa de *C. braakii* (gen *dhaD*, número de acceso GenBank AAB48844) fue amplificado por PCR y clonado en el vector de expresión pURI3-TEV. La expresión de este gen en *E. coli* dio lugar a una proteína recombinante con una etiqueta de 6 His en su amino terminal, cuyo peso molecular analizado por SDS-PAGE correspondió a la masa molecular deducida de la secuencia del gen *dhaD* (alrededor de 43 kDa) (véase **Figura 5. 10**). Gracias a dicha cola de poliHis, la proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad mediante el soporte Ag-IDA-Ni²⁺. La enzima fue eluída del soporte mediante la adición de concentraciones crecientes de imidazol, produciéndose el mayor rendimiento de elución a concentraciones de 100 y 150 mM de imidazol (**Figura 5. 10**).

Resultados

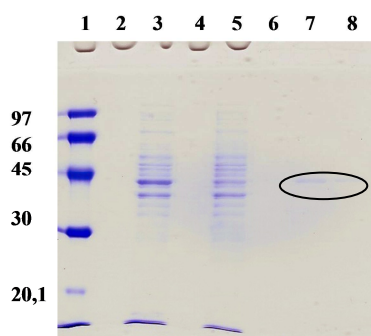


Figura 5. 10. Análisis SDS-PAGE de la purificación de Cb-GyDH. Carriles: 1. Marcador de peso molecular; 3. Sobrenadante ofrecido al soporte Ag-IDA- Ni^{2+} ; 5. Sobrenadante de la desorción con 10 mM imidazol; 6. Sobrenadante de la desorción con 70 mM imidazol; 7. Sobrenadante de la desorción con 100 mM de imidazol; 8. Sobrenadante de la desorción con 150 mM imidazol.

5. 2. 2. Estudio de la inhibición no competitiva.

La conversión biológica de glicerol a DHA catalizada por células de microorganismos o enzimas aisladas sufre una severa inhibición por el producto de la reacción (DHA), como se ha descrito en numerosas ocasiones (Bauer et al., 2005; Spencer et al., 1989; Strickland and Miller, 1968; Yamada et al., 1982). Aunque no se ha descrito claramente el tipo de inhibición que induce la DHA en la Cb-GyDH, se ha comprobado que, al igual que la mayoría de las GyDHs, esta enzima presenta una inhibición de tipo no competitiva mixta donde la V_{\max} aparente decrece y la afinidad por el sustrato decrece (aumenta la K_m aparente) al aumentar la concentración de DHA. La **Figura 5. 11** muestra una gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burke.

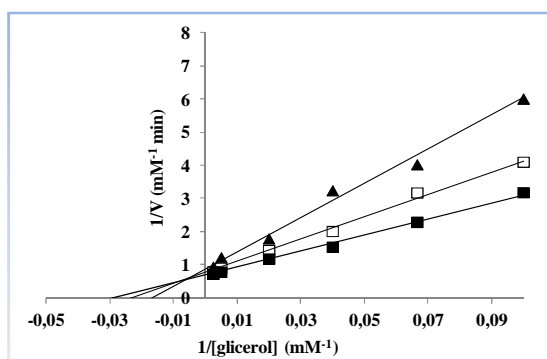


Figura 5. 11. Inhibición de la Cb-GyDH por producto (DHA) con diferentes concentraciones de glicerol y una concentración constante de NAD^+ (4,3 mM). Gráfica de dobles recíprocos de velocidad inicial y concentración de glicerol en presencia de diferentes concentraciones de DHA, (■) sin DHA; (□) 0,25 mM; (▲) 0,5 mM de DHA. Cada punto es la media de 3 experimentos con un error estándar menor al 5 %.

En cuanto a la influencia del pH en la inhibición por DHA, el pH más dependiente de la concentración de DHA fue 6. Mientras que el pH menos dependiente fue 9 (10 veces menos dependiente a la concentración de DHA). Este pH coincidió con el pH óptimo para la oxidación del glicerol a DHA.

5. 2. 3. Inmovilización de la Cb-GyDH mediante diferentes estrategias.

Mediante el uso de diferentes estrategias de inmovilización se promovió la unión de la enzima al soporte por medio de diferentes orientaciones. Se intentó aumentar la rigidez de la enzima en diferentes

regiones, para minimizar el posible cambio conformacional que podría inducir la unión del inhibidor alostérico a la enzima.

Las diferentes estrategias de inmovilización, que incluyeron tanto soportes comerciales como preparados en el laboratorio (ver **Introducción** y **Métodos**), estudiadas fueron:

- Inmovilización mediante unión covalente a soportes monofuncionales (BrCN Sepharose® y Ag-Glx) y
- Inmovilización mediante unión covalente a soportes heterofuncionales (Ag-A-Glx, Ag-IDa-Glx, Ag-IDA-Ni²⁺-Glx, Ag-B-Glx Ag-S-Glx).

Además, la obtención de un catalizador mediante inmovilización, con adecuadas propiedades de actividad y estabilidad, requirió un cuidadoso diseño y análisis de las diferentes estrategias de inmovilización.

5. 2. 3. 1. Inmovilización sobre BrCN Sepharose®.

En condiciones suaves de reacción, 4 °C y pH 7, la Cb-GyDH se inmovilizó rápida y totalmente sobre el soporte BrCN Sepharose® en 15 minutos, con un 65 % de actividad recuperada. En estas condiciones, la inmovilización procedería a través del grupo amino más reactivo de la proteína (amino terminal) (Godoy et al., 2011b; Mateo et al., 2005).

5. 2. 3. 2. Inmovilización sobre agarosa glioxil a pH 10.

La inmovilización de la enzima sobre Ag-Glx estaría dirigida por la región más rica en residuos Lys de la superficie de la enzima. En condiciones alcalinas, tampón bicarbonato de sodio y temperatura ambiente, la enzima se inmovilizó un 95 % en dos horas, con una actividad expresada del 21 % tras la reducción del derivado con NaBH₄. Cuando estudiamos el curso de la inmovilización encontramos varios problemas: se observó como las actividades de la suspensión y del sobrenadante cayeron rápidamente al incubar la enzima a pH 10 y además en presencia de bicarbonato de sodio como tampón de inmovilización, la actividad de la enzima fue inhibida.

Para intentar mejorar los resultados de la inmovilización a pH 10 y poder monitorizar adecuadamente el proceso de inmovilización, se estudió la estabilidad de la enzima soluble en presencia de otros tampones como TEA (trietilamina) y CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico), y en presencia de distintas concentraciones de aditivos como glicerol, PEG600 (polietilenglicol de 600 Da) y trehalosa (entre 10 y 40 %).

Utilizando CAPS a pH 10 como tampón de inmovilización y sin añadir aditivos, la enzima soluble conservó un 35 % de la actividad inicial tras 5 horas de incubación. En presencia de aditivos, la estabilidad de la enzima soluble mejoró notablemente con respecto a la no utilización de aditivos.

Resultados

Utilizando un 10 % de glicerol y CAPS, la enzima soluble conservó un 87 % de la actividad inicial, tras 5,5 horas de incubación. Con independencia del porcentaje ensayado de PEG600 y CAPS, la enzima conservó un 90 % de la actividad inicial tras 22 horas de incubación.

La trehalosa como aditivo, no mejoró la estabilidad de la enzima soluble en bicarbonato de pH 10. A mayor porcentaje de trehalosa peor fue la estabilidad de la enzima, llegando a conservar sólo un 58 % de la actividad inicial tras 24 de incubación a pH 10.

En el caso del tampón TEA, sin aditivos la enzima soluble conservó tras 5,5 horas de incubación el 55 % de la actividad inicial. En cambio, al adicionar aditivos, la enzima fue más estable y por ejemplo, con glicerol, conservó alrededor de un 100 % de la actividad inicial tras 6 horas.

Una vez estudiada la estabilidad de la enzima a pH 10, se procedió a su inmovilización en las condiciones que promovían una mayor estabilidad en las condiciones de inmovilización (**Tabla 5. 5**). Utilizando CAPS como tampón de inmovilización los mejores resultados se obtuvieron en presencia de un 40 % de PEG600, donde se consiguió inmovilizar un 73 % de la enzima en 5 horas y con actividad expresada próxima al 40 %. En presencia de glicerol, al incrementar la concentración del mismo hasta un 40 %, aumentó la actividad expresada hasta un 50 % pero el porcentaje de inmovilización fue tan solo de un 15 %. Utilizando tampón bicarbonato de sodio como tampón de inmovilización y en presencia de PEG600 se logró aumentar 2 veces la actividad expresada con respecto a la inmovilización en el mismo tampón pero sin aditivos. La TEA como tampón de inmovilización no se utilizó debido al bajo rendimiento de inmovilización y a la poca actividad expresada del derivado. Por tanto, las mejores condiciones de inmovilización fueron tampón CAPS más 40 % de PEG600 (v/v) y bicarbonato sódico más 20-40 % de PEG600 pH 10,05 (**Tabla 5.5**).

Tampón de inmovilización	Aditivo	(%) Aditivo (v/v)	Rendimiento inmovilización (%) ^a	Actividad expresada (%) ^b
BcNa	-	0	95	21,5
BcNa	glicerol	10	94	26,6
BcNa	glicerol	40	30	57
BcNa	PEG600	20	90	48,7
BcNa	PEG600	40	92	46,3
CAPS	-	0	89	17,6
CAPS	glicerol	10	48	30,1
CAPS	glicerol	40	15	50,5
CAPS	PEG600	10	92,5	10,1
CAPS	PEG600	20	83	21,4
CAPS	PEG 600	40	73	38,9

Tabla 5. 5. Resumen de la inmovilización de la Cb-GyDH sobre Ag-Glx en diferentes condiciones. ^a Rendimiento inmovilización = (actividad inmovilizada/actividad blanco) x100. ^b Actividad relativa expresada = (actividad expresada/actividad inmovilizada) x 100. Condiciones de inmovilización: 25 °C pH 10,05. Tampones de inmovilización: tampón bicarbonato de sodio 100 mM (BcNa); tampón CAPS 100 mM; tampón TEA 100 mM. Actividad enzimática medida en tampón fosfato de potasio 50 mM, sulfato amónico 30 mM y 0,1 M de glicerol a pH 8,5 y 30 °C.

5. 2. 3. 3. Inmovilización sobre soportes heterofuncionales.

Mediante el uso de diferentes estrategias de inmovilización sobre soportes heterofuncionales se promovió la unión enzima-soporte a través de diferentes orientaciones. Primero incubando la enzima a pH 7 para adsorberse física o químicamente (a través de grupos carboxilos, amonio cuaternarios, quelatos

metálicos, etc.) al soporte y una vez unida la enzima a pH neutro, se incubó a pH alcalino para promover la unión covalente multipuntual entre los grupos glioxil del soporte y los grupos amino de la superficie de la enzima.

Así, la Cb-GyDH se inmovilizó sobre 6 soportes heterofuncionales diferentes: Ag-A-Glx (con diferentes grados de activación del soporte con grupos amino), Ag-IDa-Glx, Ag-IDA-Ni²⁺-Glx, Ag-B-Glx Ag-S-Glx. Todos estos soportes heterofuncionales fueron activados con dos grupos funcionales: grupos glioxil y otros grupos que se indican en cada caso.

En el caso de la inmovilización sobre soportes Ag-A-Glx se utilizaron soportes activados con 10 y 40 μmol de grupos amino/mL de gel además de grupos glioxil. Por ello, primero la inmovilización se realizó a pH 7 donde la enzima se orienta sobre el soporte a través de la región con mayor carga neta negativa (Asp y Glu) y después a pH 10, donde las Lys de la enzima próximas a esa región pueden interaccionar con los grupos glioxil del soporte dando lugar a enlaces covalentes irreversibles tras la reducción con NaBH₄ del derivado. En el soporte activado con más grupos amino se inmovilizó un 100 % de la enzima en 2,5 horas y la actividad recuperada fue del 28 % (**Tabla 5. 6**).

El soporte Ag-IDA-Glx fue activado con grupos glioxil (25 μmol /mL de gel) y grupos carboxilos (15 μmol /mL gel). El protocolo de inmovilización fue similar al anterior, primero se realizó la inmovilización a pH 7 para adsorber la proteína sobre el soporte a través de la región con mayor carga neta positiva (Arg, His y Lys), y después se incubó a pH 10. En este caso, no se recuperó actividad (**Tabla 5. 6**). El soporte Ag-IDA-Ni²⁺-Glx fue activado con grupos glioxil (33 μmol /mL de gel) y grupos quelatos metálicos (7 μmol /mL gel Ni²⁺). El protocolo de inmovilización fue similar a los anteriores, primero se inmovilizó a pH 7, en este caso para orientar la enzima por la zona con más densidad de His que reaccionan con los grupos quelatos metálicos, para posteriormente incubar a pH 10. De este modo, la inmovilización fue muy rápida (100 % de inmovilización en 30 minutos) pero la actividad expresada fue baja (**Tabla 5. 6**). Se detectó que la mayor pérdida de actividad ocurrió en el segundo paso de la inmovilización, y se comprobó que inmovilizando la enzima a pH 7, a través de los quelatos metálicos del soporte, se conservó más del 30 % de su actividad. Este hecho fue muy útil porque nos permitió diseñar una estrategia de co-inmovilización de una enzima regeneradora de cofactor redox junto a esta enzima como DH principal (como podrá verse en el **apartado 5. 5. 2**).

Por último, se inmovilizó la enzima sobre un soporte Ag-S-Glx donde el soporte se activó con grupos glioxil (37 μmol /mL de gel) y grupos disulfuro (3 μmol /mL de gel). De nuevo, la inmovilización tuvo lugar en dos pasos, primero a pH 7 donde la enzima se orienta por alguna de las Cys de su superficie (posee 6 Cys) uniéndose a través de los grupos disulfuro de la superficie del soporte mediante un intercambio tiol-disulfuro y después se incubó a pH 10. Mediante este protocolo de inmovilización, se logró inmovilizar un 70 % de la enzima ofrecida y se recuperó un 31 % de la actividad.

El soporte Ag-B-Glx fue activado con grupos glioxil (30 μmol /mL de gel) y grupos boronatos (10 μmol /mL de gel). Mediante esta metodología no se mejoraron los resultados anteriores como puede observarse en la **Tabla 5. 6**.

Resultados

Soporte	Rendimiento inmovilización (%) ^a	Actividad relativa expresada (%) ^b
BrCN Sepharose®	100	65
Ag-Glx	100	40
Ag-A(10 µM/ml)-Glx	60	35,9
Ag-A(40 µM/ml)-Glx	100	27,7
Ag-B-Glx	20	35,3
Ag-S-Glx	70	31,6
Ag-IDA-Ni-Glx	100	6

Tabla 5. 6. Resumen de la inmovilización de la Cb-GyDH sobre diferentes soportes. ^a Rendimiento inmovilización = (actividad inmovilizada/actividad blanco) x100. ^b Actividad relativa expresada = (actividad expresada/actividad inmovilizada) x 100. Actividad enzimática medida en tampón fosfato de potasio 50 mM, sulfato amónico 30 mM y 0,1 M de glicerol a pH 8,5 y 30°C.

5. 2. 3. 4. Estabilidad térmica de la Cb-GyDH inmovilizada.

Cuando los derivados inmovilizados fueron térmicamente inactivados a 65 °C y pH 7 (**Figura 5. 12**), se observó que el mayor factor de estabilización se alcanzó cuando la Cb-GyDH fue inmovilizada en Ag-Glx bajo condiciones alcalinas (90 veces más estable que la enzima soluble), donde la unión enzima-soporte es mediante enlaces covalentes multipuntuales. Mientras que la inmovilización en BrCN Sepharose® fue 25 veces más estable que la enzima soluble y su vida media fue de 4 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. En este caso, la enzima se uniría covalentemente al soporte por el extremo amino terminal de la enzima.

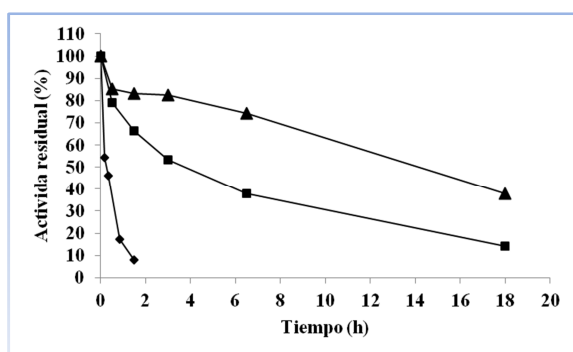


Figura 5. 12. Curso de inactivación a 65 °C y pH 7 de la Cb-GyDH inmovilizada. Símbolos: (■) BrCN Sepharose®-(Cb-GyDH); (◆) Cb-GyDH soluble; (▲) Ag-Glx-(Cb-GyDH). Actividad enzimática medida en tampón fosfato de potasio 50 mM, sulfato amónico 30 mM y 0,1 M de glicerol a pH 8,5 y 30 °C.

5. 2. 3. 5. Efecto de la inmovilización en la inhibición no competitiva.

Una vez preparada la batería de biocatalizadores, donde la enzima fue inmovilizada a través de diferentes orientaciones, se estudió la concentración de DHA que inhibía el 50 % de la actividad enzimática (IC50) de estos derivados inmovilizados. Como ha sido descrito anteriormente, la IC50 en el caso de inhibiciones del tipo no competitiva tiene una relación directa con la K_i (Brandt et al., 1987; Cer et al., 2009; Yung Chi and Prusoff, 1973).

En la **Tabla 5. 7** se pueden observar las distintas IC50 obtenidas por los diferentes derivados. La mayor mejora se obtuvo con el derivado Ag-Ni²⁺-Glx, pasando la IC50 de 0,47 a 0,8 mM, por lo que la orientación a través de la cola de poliHis produjo una mejora de la IC50 de 1,7 veces.

Soporte	IC50 ([DHA] mM)	Mejora ^(a)
<i>Soluble</i>	0,47	1
<i>BrCN Sepharose</i> [®]	0,65	1,38
<i>Ag-Glx</i>	0,61	1,29
<i>Ag-A(10 µM/mL)-Glx</i>	0,6	1,27
<i>Ag-IDA-Ni²⁺-Glx</i>	0,8	1,7
<i>Ag-Glx-S</i>	0,55	1,17
<i>Ag-B-Glx</i>	0,59	1,25

Tabla 5. 7. Estudio de la concentración de DHA que inhibe el 50 % de la actividad enzimática (IC50) de los derivados de Cb-GyDH. Estudios llevados a cabo en la cubeta espectrofotométrica como se indica en el Métodos. ^(a) Mejora con respecto a la enzima soluble (= 1) utilizada como control. Actividad enzimática medida con 0,4 U/mL en tampón fosfato de potasio 50 mM, sulfato amónico 30 mM y 0,1 M de glicerol a pH 8,5 y 30 °C.

5. 3. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN Y REACTIVACIÓN DE UNA NADH OXIDASA RECOMBINANTE DE *Thermus thermophilus* HB27 (Tt27-NOX).

El número de biotransformaciones que utilizan sistemas de regeneración de cofactores de nicotinamida ha crecido enormemente en los últimos años. Por esta razón, uno de los retos actuales en la biocatálisis es el desarrollo y optimización de sistemas de regeneración de cofactores redox simples y eficientes. Un sistema de regeneración de NAD^+ prometedor es el uso de NADH oxidasas que reduce el oxígeno a peróxido de hidrogeno mientras oxidan NADH a NAD^+ . De este modo, esta clase de enzimas pueden ser aplicadas a oxidaciones enantioselectivas de sustratos racémicos para obtener compuestos enantioméricamente puros (Ricca et al., 2011; Riebel et al., 2002, 2003).

A continuación, presentamos los resultados más relevantes obtenidos del el aislamiento, purificación, caracterización, inmovilización-estabilización y reactivación de NADH oxidasa de *T. thermophilus* HB27.

5. 3. 1. Clonaje y expresión en *E. coli* de la enzima Tt27-NOX

El gen TTC0057 fue amplificado del ADN genómico de *Thermus thermophilus* HB27. La secuencia del gen clonado reveló la presencia de una mutación en la posición 194 con respecto a la secuencia publicada del genoma de *T. thermophilus* HB27 (Henne et al., 2004). Esta diferencia, que consistió en la presencia de una Y en vez de una H, fue corroborada a través de una segunda amplificación, clonación y secuenciación del mismo gen. Este hecho es interesante, ya que la enzima homóloga de *T. thermophilus* HB8 contiene también una H en la posición 194 (**Figura 5. 13**). La Tt27-NOX de la cepa HB8 (TTHA0425) está bien estudiada (Hecht et al., 1995), y de ella se conoce la estructura cristalina obtenida por difracción de rayos X (código PDB: **1nox**).

NOX clonada	→	TTC-57	VALGYP	AE	EG	YPS	YRLPL	ERV	VLWR	205
Base de Datos KEGG NOX de cepa HB27	→	KEGG	VALGYP	AE	EG	PS	HRLPL	ERV	VLWR	205
Cristal (PDB) NOX de cepa HB8	→	PDB	VALGYP	AE	EG	PS	HRLPL	ERV	VLWR	205

Figura 5. 13. Mutación en la posición 194 de la secuencia de la Tt27-NOX.

Además, si alineamos las secuencias de la cepa HB8 y la cepa HB27, pueden observarse otras dos mutaciones adicionales (posiciones 166 y 174), siendo un total de 3 las diferencias encontradas entre las dos enzimas homólogas (véase **Figura 5. 14**).

```

HB27*      MEATLPVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ
HB8        MEATLPVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ
*****
HB27*      FWRIVVVRDPATKRALREAAFGQAHVEEAPVVLVLYADLEDALAHLEVI
HB8        FWRIVVVRDPATKRALREAAFGQAHVEEAPVVLVLYADLEDALAHLEVI
*****
HB27*      HPGVQGERREAQKQAIQRAFAAMGQARKAWASGQSYILLGYLLLLLEAY
HB8        HPGVQGERREAQKQAIQRAFAAMGQARKAWASGQSYILLGYLLLLLEAY
*****
HB27*      GLGSVPMLGFDPERVKAILGLPSHAAIPALVALGYPAEEGYPSYRLPLER
HB8        GLGSVPMLGFDPERVRAILGLPSRAAIPALVALGYPAEEGYPSHRLPLER
*****;*****;*****;*****
HB27*      VVLWR
HB8        VVLWR
*****

```

Figura 5. 14. Alineamiento de secuencias de la Tt27-NOX aislada de *T. thermophilus* HB27 y su homóloga aislada de *T. thermophilus* HB8. Secuencia HB27* resultante del clonaje y secuenciación del producto amplificado de PCR del ADN genómico de *T. thermophilus* HB27 realizada en el laboratorio del profesor Berenguer (CBM-UAM). Secuencia de *T. thermophilus* HB8 correspondiente al Gene Bank con número de entrada: CAA42707.1. Ambas secuencias se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW. (*) residuos idénticos. (:) residuos distintos, remarcados en gris.

Para caracterizar esta variante (denominada en lo sucesivo KHY) y ver los efectos que estas mutaciones puntuales tenían en su actividad catalítica, el gen amplificado TTC0057 fue clonado en el vector de expresión pET-22b(+) para expresar la proteína correspondiente en *E. coli* BL21(DE3) de forma heteróloga.

5. 3. 2. Purificación de la Tt27-NOX.

La incubación del extracto crudo proteico que contenía la Tt27-NOX a una temperatura de 80°C durante 45 minutos y posterior centrifugación, permitió conseguir un factor de purificación de 7,5 con un rendimiento cercano al 100% (Tabla 5. 8). La Figura 5. 15 muestra una electroforesis en condiciones desnaturizantes del sobrenadante después del tratamiento térmico. Para incrementar la pureza de la enzima, el sobrenadante fue ofrecido secuencialmente a Ag-PEI y Ag-DS. Estos soportes han sido descritos como capaces de adsorber la mayoría de proteínas de un extracto crudo de proteínas (Fuentes et al., 2004b; Mateo et al., 2000; Porath, 1992; Porath et al., 1975). La adsorción de la proteína de interés fue analizada y se observó que la mayoría de la Tt27-NOX permanecía en el sobrenadante y un gran porcentaje del resto proteínas se adsorbían a estos soportes. Por tanto, el protocolo diseñado para la purificación fue:

- Tratamiento térmico a 80°C durante 45 minutos y posterior centrifugación para eliminar las proteínas precipitadas.
- El sobrenadante obtenido fue ofrecido a Ag-PEI.
- El sobrenadante obtenido en el paso anterior, fue ofrecido a Ag-DS para mejorar aun más el factor de purificación. Después se recuperó el sobrenadante donde se encontraba nuestra proteína de interés.

Resultados

	Proteína (mg/ml)	AE (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento purificación (%)
Extracto crudo	26,3	0,25	1	100
Tratamiento térmico (80 °C 45 min)	6,5	1,88	7,5	100
Tratamiento térmico (80 °C 45 min) + Ag-PEI	3,3	3,69	14,7	80
Tratamiento térmico (80 °C 45 min) + Ag-PEI + Ag-DS	2,9	4,15	16,6	70

Tabla 5. 8. Parámetros de la purificación de la Tt27-NOX. Actividad específica a 65°C, pH 7 sin añadir FAD o FMN exógeno.

Con este protocolo de purificación se obtuvo un rendimiento del 70% y un factor de purificación mayor de 16.

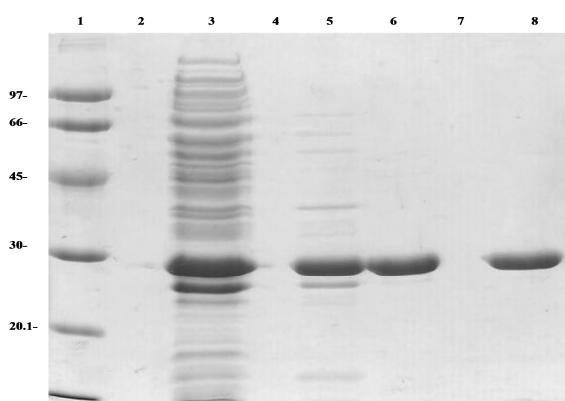


Figura 5. 15. Análisis SDS-PAGE del proceso de purificación de la NOX. Carriles; 1) Marcadores peso molecular; 3) Extracto crudo; 5) Choque térmico 80°C 45 min; 6) Sobrenadante tras 30 min de incubación junto Ag-PEI; 8) Sobrenadante tras 1 hora de incubación junto Ag-DS.

La **Figura 5.15** muestra una sola banda de proteína visible de ≈ 27 kDa correspondiente a la Tt27-NOX después de aplicar este protocolo de purificación.

5. 3. 3. Caracterización de la Tt27-NOX.

5. 3. 3. 1. Producción de H_2O_2 por la NOX.

Según se ha descrito en (Park et al., 1992), la enzima homóloga de la cepa HB8 produce exclusivamente H_2O_2 . Para comprobar si esta variante tenía el mismo comportamiento, se estudió la formación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación de NADH. La enzima produjo H_2O_2 , pero como puede observarse en la **Tabla 5. 9**, la recuperación de H_2O_2 fue menor del 100 %, concretamente un 83 %. El hecho de que la recuperación de H_2O_2 fuera menor del 100 % se discute en el **apartado 6. 3. 2. 1**.

NADH consumido (μM)	H_2O_2 formado (μM)	Proporción NADH/ H_2O_2
8,14	6,77	0,83

Tabla 5. 9. Producción de H_2O_2 por la NOX. Formación de H_2O_2 determinada como se describe en Métodos.

5. 3. 3. 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble.

Un parámetro importante para evaluar el potencial biotecnológico de una enzima es la dependencia de la actividad catalítica de la temperatura, ya que en algunas ocasiones, las condiciones operacionales son muy distintas de las fisiológicas. Para prevenir las interacciones intermoleculares proteína-proteína y así tener una referencia con la que comparar la Tt27-NOX purificada, la enzima fue inmovilizada bajo condiciones suaves en BrCN Sepharose®. En la **Figura 5. 16** se muestra el perfil de la actividad enzimática frente a la temperatura, obteniendo la máxima actividad a la temperatura más alta estudiada, 90 °C. A mayores temperaturas se producen artefactos debido a la descomposición del NADH, siendo imposible determinar la temperatura óptima de la enzima.

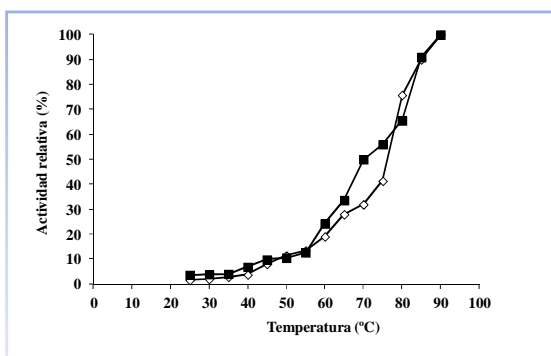


Figura 5. 16. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX. Símbolos: (◇) actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble y (■) BrCN Sepharose®-(Tt27-NOX). Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 150 μM FAD, 0,25 mM de NADH y a la temperatura indicada.

Como se puede observar en la **Figura 5. 16** tanto la enzima soluble como el derivado BrCN Sepharose® presentaron un perfil actividad enzimática/temperatura similar.

5. 3. 3. 3. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble.

Otro parámetro importante para evaluar el potencial biotecnológico de una enzima es la dependencia de la actividad catalítica del pH. Para llevar a cabo este análisis, al igual que en el anterior apartado, se midió la actividad enzimática de la Tt27-NOX soluble y de la Tt27-NOX inmovilizada sobre BrCN Sepharose® a distintos valores de pH (de 5 a 10) (**Figura 5. 17**). El pH óptimo de la enzima tanto en su forma soluble como en su forma inmovilizada fue de 5.

Resultados

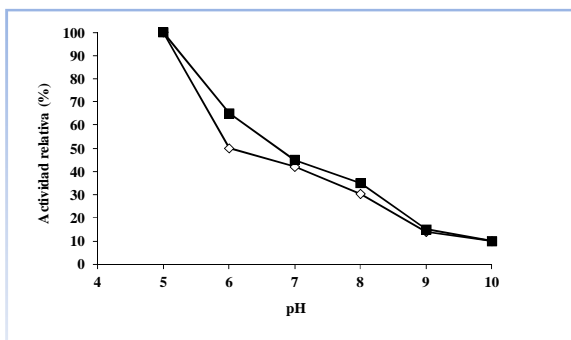


Figura 5. 17. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la Tt27-NOX. Símbolos: Tt27-NOX soluble (◇) e inmovilizada en BrCN Sepharose® (■) frente pH. Tampones utilizados: acetato sódico 50 mM pH 5,0, citrato sódico 50 mM pH 6,0, fosfato sódico 50 mM pH 7,0 y pH 8,0; carbonato sódico 50 mM pH 9,0 y pH 10,0. Actividad determinada a 37 °C, pH indicado, 150 μM FAD y 0,25 mM de NADH

Valores de pH más bajos de 5 no se midieron debido a que en esas condiciones la estabilidad del NADH es baja.

5. 3. 3. 4. Efecto del FAD y FMN exógeno sobre la actividad enzimática.

Se ha descrito que esta enzima se produce en su mayor parte como apoenzima inactiva (Park et al., 1992), aunque hemos comprobado que esta variante de Tt27-NOX recombinante mostró una significativa actividad en ausencia de FAD o FMN exógeno. De este modo, se determinó la actividad en presencia de FAD y FMN exógeno utilizando la enzima soluble e inmovilizada sobre BrCN Sepharose®. Como observamos en la **Figura 5. 18**, la actividad se incrementó en presencia de FAD o FMN exógeno. El incremento de actividad fue cercano a 350 veces, tanto para la enzima libre como para la enzima inmovilizada, ya sea en presencia de FAD o FMN exógeno.

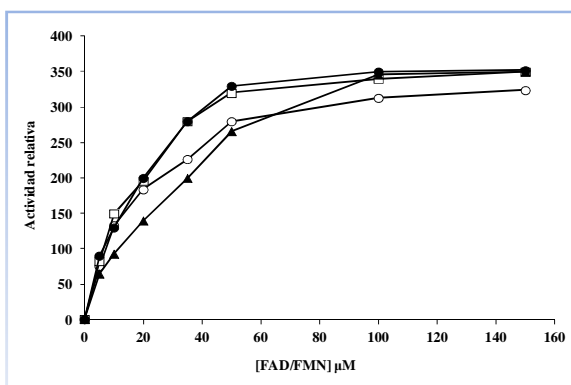


Figura 5. 18. Efecto del FAD/FMN exógeno sobre la actividad de la Tt27-NOX recombinante soluble e inmovilizada. Símbolos: (▲) enzima soluble con FAD, (●) enzima soluble con FMN, (□) enzima inmovilizada en BrCN Sepharose® con FAD, (○) enzima inmovilizada en BrCN Sepharose® con FMN. La actividad relativa se calculo tomando 1 como la actividad inicial observada en ausencia total de cofactor FAD ó FMN. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C y 0,25 mM de NADH.

En términos de actividad específica (AE), la Tt27-NOX presentó una AE >70 U/mg a pH 7 y 25 °C en presencia de concentraciones saturantes (150 μM) de FAD o FMN, unas 5 veces superior a la AE previamente descrita para su enzima homóloga procedente de *T. thermophilus* HB8 (Park et al., 1995).

Cuando la enzima inmovilizada fue incubada en presencia de cofactor exógeno y después fue lavada con agua destilada, la actividad volvió a su valor inicial. Sin embargo, la actividad de la Tt27-NOX en ausencia de cofactor exógeno no decreció después de varios lavados ni después de los pasos de

purificación de la enzima. Para estudiar si el problema se debió a la producción de la enzima recombinante en *E. coli*, se estudió el efecto del cofactor exógeno sobre la actividad de la enzima nativa (no recombinante), producida por *T. thermophilus* HB27. La **Figura 5. 19** muestra que aunque el incremento de actividad fue menor que el obtenido con la enzima recombinante, se puede observar un incremento de la actividad enzimática al añadir cofactor exógeno, tanto en la enzima nativa libre como inmovilizada. En el caso de la enzima soluble, la AE del extracto crudo de Tt27-NOX nativa fue de 0,034 U/mg en ausencia de cofactor de flavina (frente a 0,25 U/mg del extracto crudo de la enzima producida en *E. coli*), aumentando hasta 0,3 U/mg al añadir 150 μ M de cofactor de flavina.

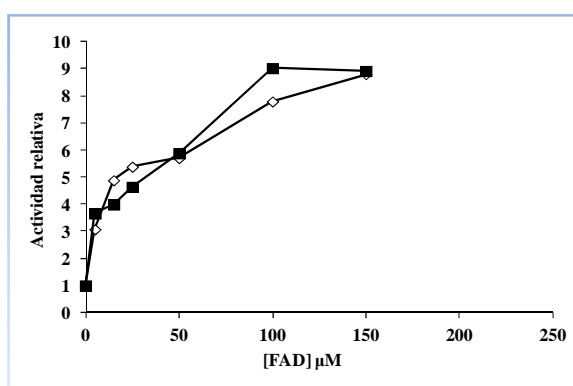


Figura 5. 19. Efecto del FAD exógeno sobre la actividad de la enzima nativa soluble y la enzima nativa inmovilizada. Símbolos: (\diamond) extracto crudo proteico (enzima soluble no purificada) y (\blacksquare) enzima inmovilizada en BrCN Sepharose®. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C y 0,25 mM de NADH.

Además, como hemos visto anteriormente, un porcentaje de moléculas de enzima fueron activas en ausencia de cofactor exógeno (AE en ausencia de cofactor 0,034 U/mg frente a 0,3 U/mg en condiciones saturantes de cofactor).

5. 3. 3. 5. Parámetros cinéticos.

La Tt27-NOX fue bastante activa a temperaturas mesófilas (25-37 °C) con respecto a otras enzimas de origen termófilo (Höllrigl et al., 2008; Pennacchio et al., 2008; Pennacchio et al., 2010a; Raghava and Gupta, 2010). Por esta razón, se calcularon los parámetros cinéticos de la enzima a 25 °C frente a los cofactores FAD, FMN y NADH (**Tabla 5. 10**). La Tt27-NOX mostró 6 veces mayor preferencia por el NADH que por el NADPH (K_m/K_{cat}), con una K_m para el NADH de 4,5 μ M.

La Tt27-NOX en presencia de FAD o FMN exógeno (150 μ M) mostró 6 veces mayor eficiencia catalítica hacia el NADH en comparación con la Tt27-NOX homóloga (cepa HB8) en las mismas condiciones (Park et al., 1995). Esta diferencia significativa se debió a que la K_m fue más baja y a que los valores de k_{cat} fueron más altos a favor de la variante de la cepa HB27. Por otro lado, la afinidad por el FAD y FMN se calculó determinando la K_m para cada uno de ellos, fijando la cantidad de NADH (10 μ M) (**Tabla 5. 10**). Como se muestra en la **Tabla 5. 10**, la afinidad por el FAD y FMN fue similar.

Resultados

	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m $\times 10^6 (M^{-1} s^{-1})$
NADH ^a	2.1 \pm 0.4	15.6 \pm 0.7	7.4
FAD ^b	34.1 \pm 6.0	-	-
FMN ^b	42.8 \pm 5.1	-	-

Tabla 5. 10. Parámetros cinéticos de la Tt27-NOX calculados a pH 7 y 25 °C. Las actividades fueron ajustadas a una regresión no lineal. ^a Parámetros cinéticos calculados para el NADH fueron calculados usando 50 μM FAD. ^b Parámetros cinéticos para los cofactores de flavina fueron calculados utilizando 10 μM de NADH.

5. 3. 3. 6. Efecto de la incubación de la Tt27-NOX a altas temperaturas.

Como se mencionó anteriormente, la adición de cofactores de flavina fue necesaria para alcanzar una alta actividad enzimática. Sin embargo, se observó un efecto inesperado cuando la Tt27-NOX se incubó a altas temperaturas en ausencia de alguno de estos cofactores de flavina. De este modo, la enzima incubada a alta temperatura y bajo condiciones limitantes de FAD o FMN fue mucho más activa que la que no sufrió dicha incubación.

La **Figura 5. 20** muestra la evolución de la actividad enzimática de diferentes preparaciones de Tt27-NOX (utilizando un crudo de proteínas donde la enzima estaba sobreexpresada) incubadas a 70 °C o 80 °C, pH 7 y en condiciones limitantes o saturadas de cofactor de flavina. La actividad enzimática en ausencia de cofactor exógeno exhibió un claro aumento, alcanzando un incremento cercano a 5 veces después de 60 minutos a 80 °C o después de 180 minutos a 70 °C. Mientras que la enzima soluble incubada a 80 °C en condiciones saturadas de cofactor de flavina no mostró dicho aumento de la actividad enzimática. Utilizando la enzima inmovilizada los resultados fueron similares. Como el comportamiento de la enzima libre y la enzima inmovilizada fue similar, fue posible descartar cualquier efecto intermolecular inducido por las altas temperaturas (por ejemplo, la agregación de la enzima). Tiempos largos de incubación hicieron decrecer la actividad enzimática, debido a la inactivación de la misma.

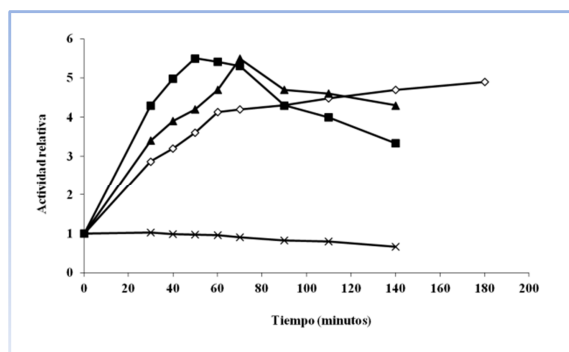


Figura 5. 20. Efecto de la incubación a alta temperatura de diferentes preparaciones de la Tt27-NOX. Símbolos: (■) enzima soluble incubada a 80 °C en condiciones limitantes de FAD, (X) enzima soluble incubada a 80 °C en condiciones saturantes de FAD, (▲) BrCN Sepharose®-(Tt27-NOX) incubado a 80 °C y (◇) enzima soluble incubada a 70 °C en condiciones limitantes de FAD. La actividad relativa fue calculada tomando 1 como la actividad inicial observada. La actividad se determinó en fosfato de sodio 50 mM a 37 °C, pH 7 y 0,25 mM de NADH.

También se estudió el efecto de la incubación de la Tt27-NOX recombinante a alta temperatura bajo condiciones diferentes de pH (valores de pH 6 a 8) en ausencia de cofactor exógeno (**Figura 5. 21**). La actividad fue mayor a pH 6, donde el incremento fue de cerca de 6 veces, y menor a pH 8, donde el incremento de la actividad fue de sólo 2 veces.

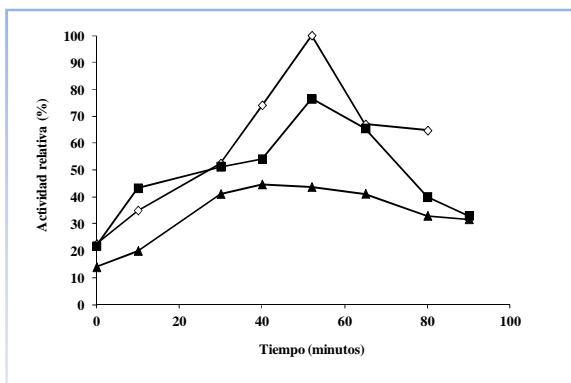


Figura 5. 21. Efecto del pH en la hiperactivación de la Tt27-NOX inducida por temperatura. Símbolos: (\diamond) enzima soluble a pH 6, (\blacksquare) enzima soluble a pH 7 y (\blacktriangle) enzima soluble a pH 8. La actividad relativa se calculó tomando como 100 % la actividad máxima observada. La actividad se determinó en fosfato de sodio 50 mM a 65 °C, pH 7, 0,25 mM de NADH y sin cofactor exógeno.

Esta interesante hiperactivación inducida por la temperatura se manifestó también en el gráfico de Arrhenius (véase **Figura 5. 22**), donde es evidente que la enzima incubada a alta temperatura presenta una menor energía de activación que la enzima incubada a temperatura mesófila (36 ± 1 frente a 48 ± 0.8 KJ/mol).

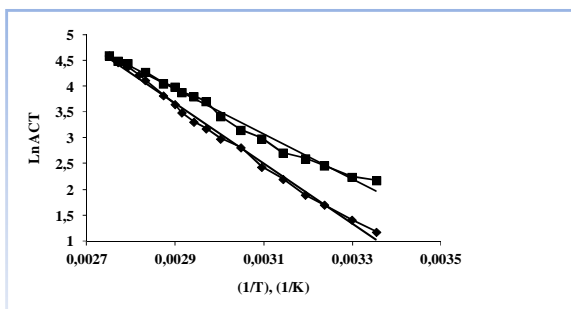


Figura 5. 22. Gráfico de Arrhenius de la reacción catalizada por la Tt27-NOX preincubada a alta t° y no preincubada. Símbolos: (\blacktriangledown) Enzima soluble no preincubada a alta temperatura y (\blacksquare) enzima soluble preincubada a 80 °C durante 45 min. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 150 μ M FAD y 0,25 mM de NADH.

La hiperactivación térmica de la enzima condujo a una buena actividad específica (4,15 U/mg) en condiciones limitantes de cofactor de flavina a 65 °C. Este valor de actividad supone el 0,26 % respecto a la actividad específica en presencia de concentraciones saturantes de cofactor de flavina bajo las mismas condiciones de temperatura y pH. Este incremento de la actividad, al incubarse la NOX a altas temperaturas, se mantuvo a 4 °C durante más de 60 horas (95 % de la actividad inicial hiperactivada). A 25 °C, la actividad de la enzima decreció más rápidamente que a 4 °C (decreció un 20% en 60 horas), aunque los valores de hiperactivación pudieron ser recuperados mediante una nueva incubación de la proteína a altas temperaturas (80 °C).

5. 3. 3. 7. Caracterización de la estabilidad de la Tt27-NOX soluble.

La Tt27-NOX soluble presentó una gran estabilidad en condiciones suaves tanto de pH como temperatura. En condiciones de pH 7 y 83 °C, la enzima soluble presentó una vida media de cuatro horas. Mientras que a pH ácido y alcalino la NOX fue más inestable. Cuando se combinaron pH ácidos o alcalinos con temperaturas relativamente altas, la enzima fue bastante más inestable, como por ejemplo, a pH 9 y 80 °C, donde presentó una vida media de dos horas, mientras que a pH 5 y 50 °C la enzima tuvo una vida media de menos de 50 minutos.

Por tanto, la enzima presentó una alta estabilidad frente a la temperatura, sin embargo la combinación de agentes inactivantes como altas temperatura y pHs ácidos o básicos, provocó una inactivación más rápida de la enzima. Además, se ha comprobado que la inactivación a pH ácido depende de la concentración de enzima, posiblemente debido a la disociación de las subunidades. Mientras que, por ejemplo, la vida media de la enzima a pH 5 y 65 °C, de una disolución enzimática con una concentración de 0,1 mg/ml fue cercana a los 10 minutos, la de una disolución enzimática con una concentración de 0,01 mg/ml fue menor de 5 minutos.

En cuanto a la estabilidad frente a disolventes orgánicos, hemos comprobado como por ejemplo en 60 % de dioxano a 37 °C y pH 5 el derivado BrCN Sepharose[®]-(Tt27-NOX) tuvo una vida media de menos de 6 horas.

5. 3. 4. Inmovilización y estabilización de la Tt27-NOX.

La inmovilización de enzimas permite una fácil separación del medio de reacción y reutilización del biocatalizador durante varios ciclos de reacción. De este modo, la recuperación del producto es mucho más fácil y a menudo, si es propiamente diseñada, mejora la resistencia de las enzimas a la inactivación causada por diferentes agentes desnaturizante (incluyendo pH extremo, altas temperaturas, presencia de disolventes orgánicos, etc.) (Mateo et al., 2006).

Sin embargo, las técnicas de inmovilización pueden afectar positiva o negativamente a la estabilidad térmica y a la actividad catalítica de la enzima. La obtención de un catalizador mediante inmovilización, con adecuadas propiedades de actividad y estabilidad, requiere un cuidadoso diseño y análisis de las diferentes estrategias de inmovilización. Por esa razón se preparó una batería de derivados con la Tt27-NOX inmovilizada a través de diferentes orientaciones y con diferentes grados de rigidificación de la estructura terciaria de la enzima, con el fin de encontrar el protocolo de inmovilización óptimo que promoviera la mayor estabilización y que afectara lo menos posible a la actividad catalítica de la enzima.

5. 3. 4. 1. Inmovilización de la Tt27-NOX mediante diferentes estrategias.

La Tt27-NOX fue inmovilizada mediante técnicas de inmovilización reversibles y mediante técnicas de inmovilización irreversibles. Las diferentes estrategias de inmovilización incluyeron tanto soportes comerciales como preparados en el laboratorio (ver **Introducción y Métodos**). Las metodologías utilizadas fueron:

- Inmovilización en intercambiadores aniónicos: DEAE Sepharose[®], Ag-MANAE, Ag-PEI y Q-Sepharose[®].
- Inmovilización en intercambiadores catiónicos: Ag-DS, Carboximetil Sepharose[®] y Sulfopropil Sepharose[®].
- Inmovilización en soportes cromatográficos de afinidad Cu²⁺ (Ag-IDA-Cu²⁺).
- Inmovilización mediante unión covalente a soportes monofuncionales (BrCN Sepharose[®] y Ag-Glx).
- Inmovilización mediante unión covalente a soportes heterofuncionales (Ag-IDA-Glx)

También se emplearon técnicas post-inmovilización para estabilizar la estructura cuaternaria de la enzima mediante el entrecruzamiento del catalizador previamente inmovilizado con dextrano-aldehído (dex-CHO).

Cabe destacar, que también se utilizaron distintos métodos de inmovilización sobre soportes Ag-Glx tanto a pH alcalino como a pH neutro. En este último caso, también se utilizó ditioneitol (DTT) como ayudante de la inmovilización. Se ha descrito como la inmovilización sobre Ag-Glx a pH 10 logra una orientación a través de la región superficial más rica en Lys, mientras que a pH 7 (donde los únicos grupos reactivos de la superficie de la proteína son los amino terminales), la proteína multimérica se inmovilizaría siempre y cuando los amino terminales, de cada una de las subunidades, interaccionaran en el mismo plano con el soporte de forma simultánea (Bolívar et al., 2009c; Mateo et al., 2006). La adición de DTT en la inmovilización sobre Ag-Glx a pH 7 se ha descrito como capaz de estabilizar los enlaces imino entre grupos los aldehídos del soporte y los grupos amino reactivos de la enzima (Bolívar et al., 2009b).

En la **Tabla 5. 11** se muestra el resumen de los resultados de inmovilización obtenidos. Los peores resultados se han obtenido con los soportes de intercambio iónico (aniónicos y catiónicos), tanto en porcentaje de inmovilización como en actividad expresada. En cambio, la inmovilización irreversible ha dado los mejores resultados, obteniéndose en algunos casos el 100 % de inmovilización (por ejemplo, en el caso de Ag-IDA-Glx, BrCN Sepharose[®], Ag-Glx pH 10) y una actividad expresada de entre el 60-80 % en muchos casos. La inmovilización en Ag-Glx a pH neutro no consiguió mejorar el porcentaje de actividad expresada obtenido en la inmovilización en el mismo soporte pero en condiciones de pH alcalino. Además, el grado de entrecruzamiento de la agarosa (BCL) utilizada no fue determinante en la recuperación de la actividad.

Resultados

Soporte	Rendimiento inmovilización (%) ^a	Actividad relativa expresada (%) ^b
Ag4BCL-Glx pH 7	70	34
Ag4BCL-Glx pH 7+DTT	80	45
Ag4BCL-Glx pH 10	100	62
Ag6BCL-Glx pH 10	85	60
Ag10BCL-Glx 10 pH 10	85	60
BrCN Sepharose®	100	80
Ag4BLC-IDA-Cu ²⁺	100	80
Ag4BLC-IDA-Cu ²⁺ -Glx	100	62
Ag4BCL-MANAE	10	0
Sulfopropil Sepharose®	20	0
DEAE Sepharose®	0	0

Tabla 5. 11. Inmovilización de la Tt27-NOX sobre diferentes soportes.^a Rendimiento inmovilización = (actividad inmovilizada/actividad blanco) x100.^b Actividad relativa expresada = (actividad expresada/actividad inmovilizada) x 100.

5. 3. 4. 2. Estabilización de la estructura cuaternaria.

Uno de los principales problemas con el que nos podríamos encontrar a la hora de estabilizar enzimas multiméricas mediante técnicas de inmovilización sería la disociación de subunidades. En el caso de que alguna de las subunidades no estuvieran involucradas en la unión de la enzima al soporte, al llevar a cabo los diferentes reusos del biocatalizador ó incluso durante el transcurso mismo de la biotransformación, la enzima podría inactivarse por disociación de subunidades. Por ello, para comprobar si mediante las técnicas de inmovilización utilizadas, todas las subunidades de la enzima se inmovilizaban covalentemente sobre el soporte, los derivados se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos en presencia de SDS. Como se puede observar en la **Figura 5. 23**, en todos los catalizadores inmovilizados se observaron bandas de proteína correspondientes a las subunidades liberadas.

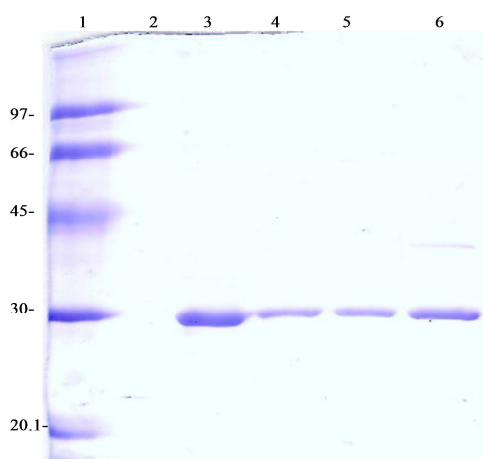


Figura 5. 23. Análisis SDS-PAGE de la unión de la Tt27-NOX a los soportes BrCN Sepharose® y Ag-Glx. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (kDa); 3) BrCN Sepharose®-(Tt27-NOX); 4) Ag-Glx pH 7-(Tt27-NOX); 5) Ag-Glx pH 7+DTT-(Tt27-NOX); 6) Ag-Glx pH 10-(Tt27-NOX).

Por tanto, la inmovilización no involucró a todas las subunidades de la enzima (hecho que ocurrió también en otros derivados como el Ag-IDA-Glx). Este problema podría solucionarse mediante una estrategia de entrecruzamiento intersubunidades de la enzima usando polímeros polifuncionales como el dex-CHO (Betancor et al., 2003; Fernandez-Lafuente et al., 2001). Después de su reducción, el dex-CHO sería un polímero inerte por lo que las interacciones indeseadas entre el polímero y la enzima ó el entre el polímero y los reactivos serían bastante improbables.

5. 3. 4. 2. 1. Entrecruzamiento de la Tt27-NOX inmovilizada con dextrano-aldehído. Optimización del entrecruzamiento con dextrano-aldehído.

Tras los resultados obtenidos en el apartado anterior, se llevó a cabo el entrecruzamiento con dextrano-aldehído (dex-CHO) de los derivados inmovilizados en Ag-Glx y BrCN Sepharose®. Además, se optimizó el entrecruzamiento tomando como modelo el derivado Ag-Glx, donde la Tt27-NOX se inmovilizó a pH 10. Se estudiaron diferentes variables como el tamaño del dex-CHO, el tiempo de incubación del derivado con el dex-CHO, la temperatura a la que se llevó a cabo esta incubación y la relación másica entre la cantidad de dex-CHO y de proteína utilizada. Cabe señalar, que el tratamiento con dex-CHO sobre los soportes BrCN Sepharose® y Ag-Glx, tras su reducción, provocó una pérdida de entre el 20 % y 30 % de la actividad expresada.

En cuanto al tamaño de dex-CHO, se probaron los siguientes tamaños: 1.5, 6, 70 y 200 kDa. Para comprobar si la estructura cuaternaria seguía sin estabilizarse, los derivados se hirvieron a 100 °C durante 5 minutos en presencia de SDS. En la **Figura 5. 24** puede observarse como el entrecruzamiento con dex-CHO fue más efectivo a partir de un tamaño de 6 kDa.

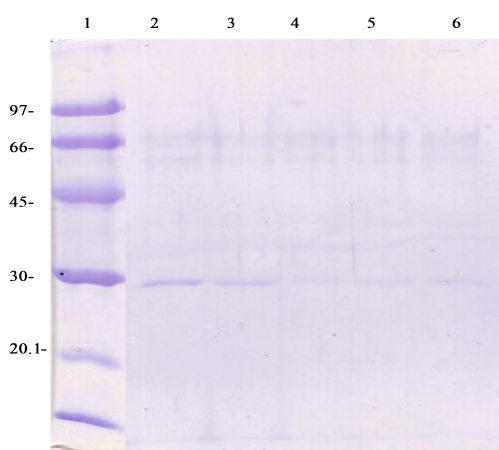


Figura 5. 24. Análisis SDS-PAGE del efecto del tamaño de dex-CHO (kDa) en la estabilización de la estructura cuaternaria de la Tt27-NOX. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (kDa); 2) Ag-Glx-(Tt27-NOX); 3) Ag-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzado con dex-CHO de 1.5 kDa; 4) Ag-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzado con dex-CHO de 6 kDa; 5) Ag-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzado con dex-CHO de 70 kDa; 6) Ag-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzado con dex-CHO de 200 kDa. Condiciones entrecruzamiento: 10 mg/mL de dex-CHO de diferentes tamaños (kDa) incubados 16 horas a 25 °C en la concentración indicada.

El siguiente paso fue estudiar la variable tiempo de incubación de la enzima inmovilizada junto a dex-CHO. En este caso, tras incubar a diferentes tiempos (3, 16 y 48 horas), se pudo observar que a más tiempo de incubación más efectivo fue el entrecruzamiento. También se estudió el efecto de la

Resultados

temperatura a la que se llevó a cabo la incubación, comparando la incubación a 25 °C y a 4 °C, sin encontrar grandes diferencias.

La última variable estudiada fue la concentración en miligramos de dex-CHO por miligramo de Tt27-NOX. Se estudiaron concentraciones desde 3 mg de dex-CHO por mg de Tt27-NOX hasta 40 mg de dex-CHO por mg de Tt27-NOX. A partir de 15 mg de dex-CHO por mg de Tt27-NOX se observó que la cantidad de subunidades que se liberaban era mucho menor.

Como puede observarse en la **Figura 5. 25**, los derivados Ag-Glx entrecruzados con 35 y 40 mg de dx-COH por mg de Tt27-NOX, no liberaron subunidades al medio tras el tratamiento a 100 °C durante 5 minutos en presencia de SDS, por tanto, la estructura cuaternaria de la enzima fue estabilizada.

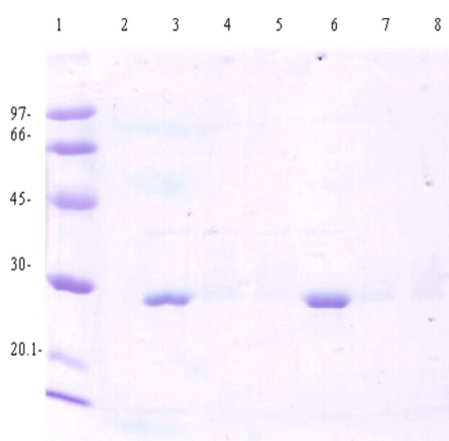


Figura 5. 25. Análisis SDS-PAGE del efecto de la concentración de dex-CHO (en mg) por mg de Tt27-NOX en la estabilización de la estructura cuaternaria. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (kDa); 3. Ag4BCL-Glx-(Tt27-NOX); 4. Ag4BCL-Glx entrecruzado con 35 mg dex-CHO de 6 kDa/mg de Tt27-NOX; 5. Ag4BCL-Glx entrecruzado con 40 mg de dex-CHO 6 kDa/mg de Tt27-NOX; 6. Ag6BCL-Glx-(Tt27-NOX); 7. Ag6BCL-Glx entrecruzado con 35 mg de dex-CHO 6kDa/mg de (Tt27-NOX); 8. Ag6BCL-Glx con 40 mg de dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX. Condiciones entrecruzamiento: dex-CHO de 6 kDa incubado 16 horas a 25 °C en la concentración indicada.

5. 3. 4. 3. Estabilidad térmica de la Tt27-NOX inmovilizada.

En la **Figura 5. 26** se puede observar la estabilidad a pH 7 y 83 °C de diferentes derivados de Tt27-NOX, además de la preparación soluble de esta enzima. En estas condiciones, la enzima soluble y el derivado BrCN Sepharose® tuvieron una vida media de 4,5 horas y unas 18 horas respectivamente. Los derivados Ag-IDA-Cu²⁺ y Ag-IDA-Glx (además, de comportarse de manera similar) no mejoraron la estabilidad del derivado BrCN Sepharose®. Los derivados más estables fueron aquellos donde la enzima fue inmovilizada en Ag-Glx, tanto a pH 7 (en presencia o ausencia de DTT) y posterior incubación a pH 10 como inmovilizada directamente a pH 10, donde los derivados presentaron vidas medias superiores a las 20 horas.

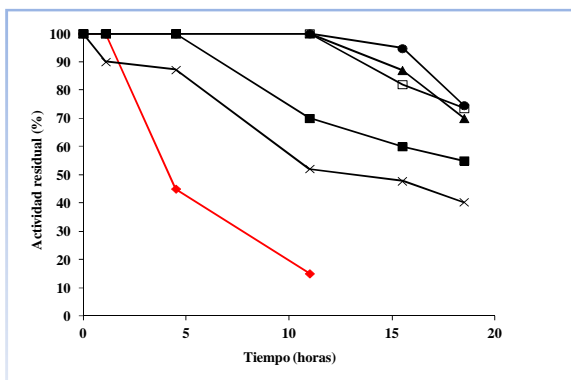


Figura 5. 26. Curso de inactivación a pH 7 y 83°C de la Ti27-NOX inmovilizada. Símbolos: (♦) Ti27-NOX soluble (0,1 mg/mL); (■) BrCN Sepharose®-(Ti27-NOX); (X) Ag-IDA-Cu2+-(Ti27-NOX); (□) Ag-Glx-(Ti27-NOX) pH 7; (●) Ag-Glx 4-(Ti27-NOX) pH7+DTT; (▲) Ag-Glx-(Ti27-NOX) pH 10. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FAD y 0,25 mM de NADH.

Teniendo en cuenta los resultados de la **Tabla 5. 11** y de la **Figura 5. 26**, se decidió centrarse en los derivados Ag-Glx pH 10 y estudiar su estabilidad a pH ácido y básico, además de comparar dichas estabilidades con las de los catalizadores inmovilizados y entrecruzados con dex-CHO.

En la **Figura 5. 27** se puede observar la estabilidad a pH 9 y 80 °C, donde el derivado más estable fue el Ag-Glx sin entrecruzar con dex-CHO. Mediante la inmovilización de la enzima sobre el soporte Ag-Glx a pH 10 se logró un factor de estabilización de 20 veces con respecto a la enzima soluble (que tuvo una vida media de tan sólo 2 horas frente a las 40 horas del derivado Ag-Glx).

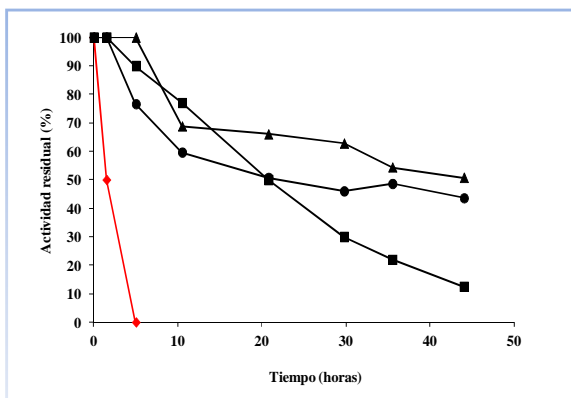


Figura 5. 27. Curso de inactivación a pH 9 y 80°C de la Ti27-NOX inmovilizada. Símbolos: (♦) Ti27-NOX soluble (0,1 mg/mL); (■) BrCN Sepharose®-(Ti27-NOX); (▲) Ag-Glx-(Ti27-NOX); (●) Ag-Glx-(Ti27-NOX) entrecruzado con 40 mg de dex-CHO 6 kDa/mg de Ti27-NOX. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

Como se ha comentado anteriormente, la enzima soluble en condiciones de pH ácido y temperaturas relativamente bajas, se inactivó en minutos dependiendo de su concentración. Así, como se puede observar en la **Figura 5. 28**, se consiguió mejorar muy significativamente la estabilidad de la enzima a pH ácido.

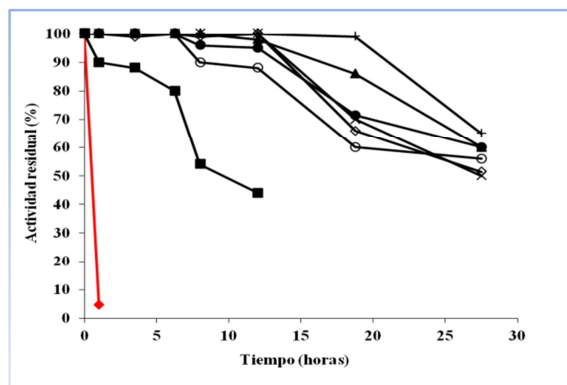


Figura 5. 28. Curso de inactivación a pH 5 y 80°C de la Tt27-NOX inmovilizada. Símbolos: (♦) Tt27-NOX soluble (0,1 mg/mL); (■) BrCN Sepharose®-(Tt27-NOX); (▲) Ag4BCL-Glx-(Tt27-NOX); (×) Ag4BCL-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzada con 35 mg de dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX; (●) Ag4BCL-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzada con 40 mg de dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX; (○) Ag6BCL-Glx-(Tt27-NOX); (+) Ag6BCL-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzada con 35 mg dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX; (◇) Ag6BCL-Glx-(Tt27-NOX) entrecruzada con 40 mg dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

En estas condiciones, se llegaron a obtener derivados con una vida media de más de 24 horas en condiciones muy drásticas, donde la vida media del derivado BrCN Sepharose® fue de unas 8 horas y de la enzima soluble de tan sólo varios minutos. El derivado óptimo bajo estas condiciones de inactivación fue el resultante de la inmovilización de Tt27-NOX en Ag-Glx a pH 10 y posteriormente entrecruzado con dextrano-aldehído de 6KDa en una relación másica 1:35 (polímero: proteína).

5. 3. 4. 4. Estabilidad de la Tt27-NOX inmovilizada frente a disolventes orgánicos.

Debido a la baja solubilidad que presentan algunos sustratos en medio acuoso, el uso de catalizadores podría requerir la adición de disolvente orgánico para facilitar la disolución del sustrato en el medio de reacción. En muchos casos, la actividad enzimática podría verse afectada por la presencia de estos disolventes en el medio de reacción, así como la estabilidad de la enzima. Por ello, se llevaron a cabo estudios para comprobar la estabilidad y actividad de la Tt27-NOX en presencia disolventes orgánicos.

En cuanto a la actividad en presencia de concentraciones muy altas de disolvente, como 80% de dioxano, ésta se ve muy afectada siendo solamente el 30% de la actividad que presentaba la enzima en medio totalmente acuoso.

También, se estudió la estabilidad de los derivados inmovilizados en Ag-Glx y BrCN Sepharose® bajo diferentes condiciones de temperatura en presencia de dioxano o acetona. La enzima inmovilizada en BrCN Sepharose® se utilizó como referencia para evitar posibles problemas de agregación en presencia de altas concentraciones de disolventes.

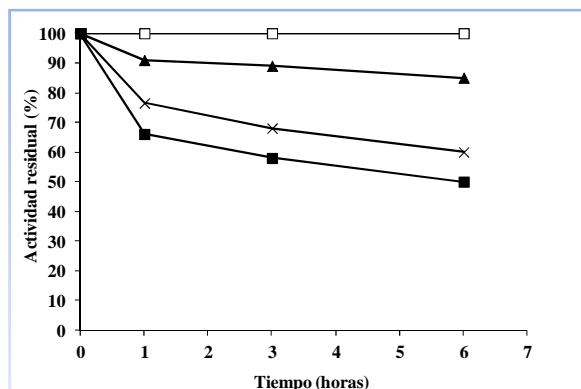


Figura 5. 29. Estabilidad en presencia de disolventes orgánicos a pH 7 de la Tt27-NOX inmovilizada. Símbolos: (■) BrCN Sepharose® incubado en presencia de 60 % de dioxano a 37 °C; (X) Ag-Glx incubado en presencia de 80 % de dioxano y 60 °C; (▲) Ag-Glx incubado en presencia de 80 % de dioxano y 45 °C; (□) Ag-Glx incubado en presencia de 80 % de dioxano y 37 °C. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

Como puede observarse en la **Figura 5. 29**, la vida media de la enzima inmovilizada en BrCN Sepharose® incubado a 37 °C en presencia de 60 % de dioxano fue de algo más de 6 horas, mientras que la enzima inmovilizada en Ag-Glx incubado en 80 % de acetona o dioxano a 37 °C conservó el 100 % de la actividad inicial tras 6 horas de incubación.

5. 3. 5. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada.

5. 3. 5. 1. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada a altas concentraciones de agentes caotrópicos. Optimización de la reactivación.

Para estudiar la reactivación de los diferentes derivados se procedió a su incubación en una disolución saturada de un agente caotrópico (Lippincott and Apostol, 1999; Mukhopadhyay, 1997). En los experimentos llevados a cabo con la Tt27-NOX fue necesario más de una hora de incubación junto a altas concentraciones de guanidina para lograr la inactivación total de la actividad enzimática. Por ello, las incubaciones fueron realizadas durante 16 horas, a temperatura ambiente y pH 7, de este modo se consiguieron valores de actividad muy bajos y así se facilitó el estudio del comportamiento de la reactivación. Para optimizar dicha reactivación se estudiaron diferentes condiciones de pH y temperatura de incubación.

Los derivados inactivados, total o parcialmente, se incubaron en tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y temperatura ambiente. Los mejores resultados de reactivación se observaron con la enzima inmovilizada a pH 10 en el soporte Ag-Glx (**Figura 5. 30**), alcanzándose cerca de un 30 % de la actividad inicial después del proceso de reactivación. Mientras que la Tt27-NOX inmovilizada en el soporte Ag-Glx a pH 7 logró recuperar un 12 % de la actividad inicial y el derivado Ag-IDA-Glx logró reactivarse al 25 % de la actividad inicial.

Resultados

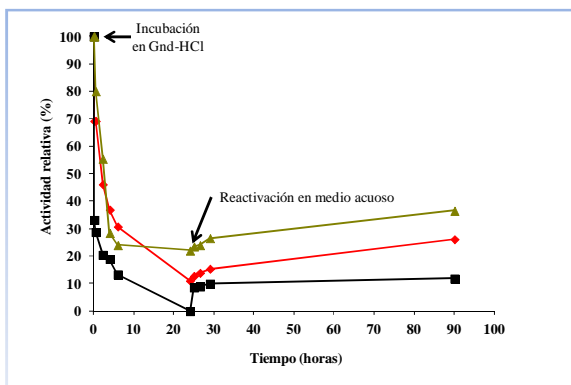


Figura 5. 30. Curso de inactivación en guanidina 8 M pH 7 de la Tt27-NOX inmovilizada y reactivación en fosfato de sodio 10 mM a temperatura ambiente y pH 7. Símbolos: (■) Ag-Glx pH 7; (◆) Ag-IDA-Glx; (▲) Ag-Glx pH 10. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

Puesto que los valores de reactivación no fueron óptimos, se realizaron experimentos para optimizar la reactivación del derivado Ag-Glx donde la enzima fue inmovilizada a pH 10 (obtuvo el mejor resultado de reactivación a 25 °C y pH 7) combinando diferentes temperaturas y pHs de incubación de los derivados a reactivar. Probamos además de temperatura ambiente, 45 °C y 65 °C. En cuanto a pH, probamos pH 7, 5 y 9.

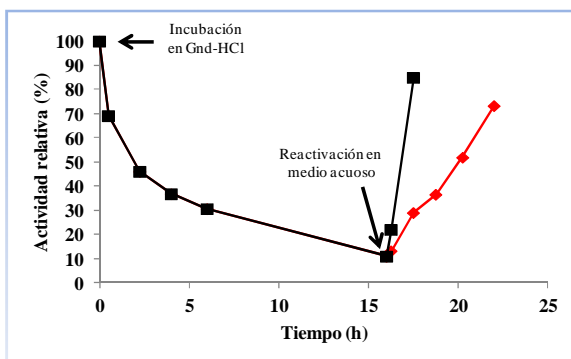


Figura 5. 31. Curso de inactivación en guanidina 8 M pH 7 de la Tt27-NOX inmovilizada en Ag-Glx y reactivación en fosfato de sodio 10 mM pH 7 a 45 °C (◆) y 65 °C (■). Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

Cuando las condiciones de incubación fueron 45 °C y pH 7, la enzima inmovilizada en Ag-Glx a pH 10 logró recuperar en torno a un 70 % de la actividad (**Figura 5. 31**). Pero, los mejores resultados de reactivación se obtuvieron con las condiciones de incubación 65 °C y pH 7. Como se puede observar en la **Figura 5. 31**, se recuperó en torno a un 85 % de la actividad inicial con la enzima inmovilizada en Ag-Glx a pH 10 en poco más de 1 hora de incubación.

Como se mencionó anteriormente, se probaron otras condiciones de reactivación: 45 °C y pH 5, 45 °C y pH 9, 65 °C y pH 5, 65 °C y pH 9, y temperatura ambiente a pH 5 y 9. Los resultados obtenidos fueron peores que los obtenidos a pH 7 y en el mejor de los casos (pH 5 y 45 °C) conseguimos recuperar cerca del 50 % de actividad inicial con el derivado Ag-Glx.

Por último, quisimos comprobar la capacidad de reactivación de los derivados tratados con dextrano-aldehído, donde la estructura cuaternaria estaba estabilizada, y para lo cual tomamos como ejemplo dos derivados Ag-Glx donde la enzima se inmovilizó a pH 10, uno tratado con 25 mg de dextrano-aldehído por mg de Tt27-NOX y el otro tratado con 30 mg de dextrano-aldehído por mg de

Tt27-NOX. En las condiciones óptimas de reactivación, estos derivados lograron recuperar entre un 50 % y 60 % de la actividad inicial (véase **Figura 5. 32**), porcentajes menores que los logrados con los derivados inmovilizados homólogos sin entrecruzar. Un caso similar ocurrió con los derivados BrCN Sepharose® con y sin tratar con dextrano-aldehído. Los derivados entrecruzados se reactivaron con una eficiencia 2 veces inferior a la de los derivados no entrecruzados con dex-CHO.

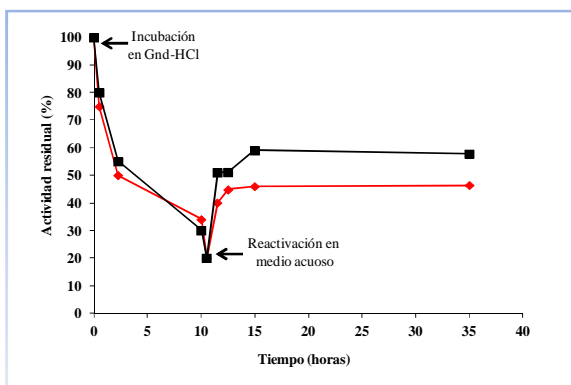


Figura 5. 32. Curso de inactivación de la Tt27-NOX inmovilizada en guanidina 8 M a pH 7 y reactivación en fosfato de sodio 10 mM pH 7 y 65 °C. Símbolos: (■) Ag-Glx entrecruzado con 30 mg de dex-CHO 6kDa/mg de Tt27-NOX; (◆) Ag-Glx entrecruzado con 25 mg de dex-CHO 6 kDa/mg de Tt27-NOX. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

5. 3. 5. 2. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada a altas temperaturas y pH ácido.

Los derivados de Tt27-NOX inmovilizada en Ag-Glx a pH 10, a pH 7 (y posterior incubación a pH 10) y en Ag-IDA-Glx a pH 7 (y posterior incubación a pH 10) fueron parcialmente inactivados mediante la incubación a pH 5 y 90 °C. Tras su inactivación parcial (por debajo del 40% de su actividad inicial), estos derivados fueron incubados en una disolución saturada de guanidina para lograr su desplegamiento total y posteriormente se incubaron a pH 7 y 65 °C, que como se describió anteriormente, fueron las mejores condiciones de reactivación estudiadas. La enzima inmovilizada en Ag-Glx a pH 10 recuperó cerca del 90 % de la actividad inicial, la enzima inmovilizada en Ag-Glx a pH 7 y posteriormente incubada a pH 10 llegó a recuperar cerca del 80 % de la actividad y algo menor fue la reactivación de la enzima inmovilizada en el soporte Ag-IDA-Glx que logró recuperar el 75 % de la actividad inicial (**Figura 5. 33**).

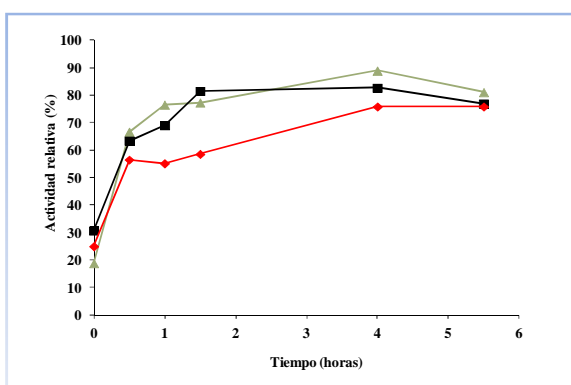


Figura 5. 33. Curso de reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7 y 65 °C, tras inactivación parcial a pH 5 y 90 °C, y posterior incubación en guanidina 8 M pH 7. Símbolos: (■) Ag-Glx pH 7-10; (◆) Ag-IDA-Glx; (▲) Ag-Glx pH 10. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

5. 3. 5. 3. Reactivación de la Tt27-NOX inmovilizada inactivada en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos.

La NOX inmovilizada en Ag-Glx a pH 10 fue el derivado más estable y con el que se obtuvieron los mejores resultados de reactivación. Así pues, fue sometido a la inactivación en presencia de altas concentraciones de disolventes orgánicos (60 % y 80 % de dioxano), pH ácido y 45 °C. Como puede observarse en la **Figura 5. 34**, tanto en 60 % como en 80% de dioxano, a pH 5 y 45°C, se logró recuperar prácticamente el 100 % de la actividad inicial tras incubarlo 1 hora en las condiciones óptimas de reactivación (tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7 y 65 °C).

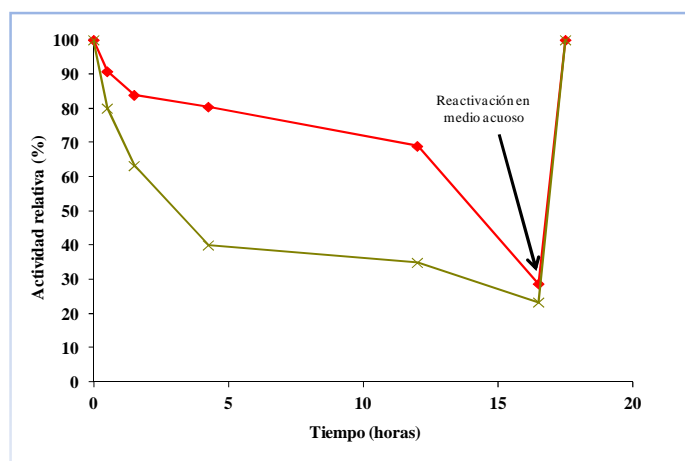


Figura 5. 34. Curso de inactivación de la Tt27-NOX inmovilizada a pH 5 y 45 °C, con dioxano al 60 % (♦) y 80 % (X), y posterior reactivación en fosfato de sodio 10 mM pH 7 y 65 °C. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 µM FMN y 0,25 mM de NADH.

Además, este mismo derivado fue sometido a sucesivos ciclos de inactivación-reactivación, donde las condiciones de inactivación fueron pH 5, 37 °C y 60 % de dioxano, mientras que las condiciones de reactivación fueron tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7 y 65 °C (véase **Figura 5. 35**).

Como se puede observar en la **Figura 5. 35**, se logró recuperar más de un 90 % de la actividad inicial tras tres ciclos sucesivos de inactivación-reactivación. Además, cabe destacar que la reactivación; en cada ciclo; se produjo rápidamente (en menos de una hora).

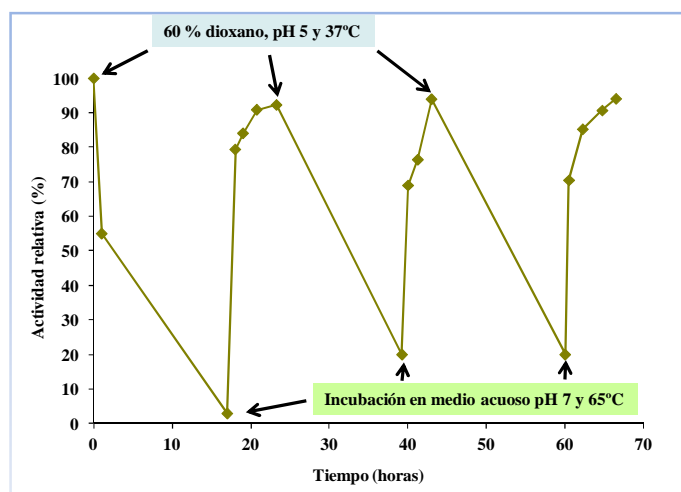


Figura 5. 35. Ciclo de inactivaciones (pH 5, 37 °C y 60 % dioxano)-reactivaciones en medio acuoso (pH 7 y 65 °C) de la Tt27-NOX inmovilizada en Ag-Glx a pH 10 (◆). Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

5. 4. EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN DE DIFERENTES VARIANTES RECOMBINANTES DE LA NADH OXIDASA DE *Thermus thermophilus* HB27.

5. 4. 1. Expresión de las diferentes variantes de Tt27-NOX en *E. coli*. Secuencia de las variantes de la Tt27-NOX.

Debido a las diferencias encontradas entre la Tt27-NOX descrita por Park y col. (Park et al., 1992) y la variante descrita en la presente Tesis Doctoral, se llevaron a cabo diferentes mutaciones en las posiciones 166, 174 y 194 del gen TTC0057 de *T. thermophilus* HB27 (**Figura 5. 36**). Aparte de la variante anteriormente estudiada se construyeron 5 variantes más. La variante denominada KHY se corresponde con la variante estudiada en el **apartado 5. 3**. La variante RRH se corresponde con la enzima descrita anteriormente por Park y col. de la cepa HB8 (Park et al., 1992) y como aparece en el Protein Data Bank (PDB) con el código **1nox**. La variante RHH se corresponde con la secuencia que aparece en el atlas genómico BacMap (Stothard et al., 2005). La variante KHH se corresponde con la secuencia del genoma publicado de *T. thermophilus* HB27 por Henne y col., (Henne et al., 2004) y como aparece en la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>).

```
KRY MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
RRH MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
RHY MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
RHH MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
KHH MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
KHY MEATLPLVLDAKTAALKRRSIRRYRKDPVPEGLLREILEAALRAPSAWNLQ 50
*****

KRY PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
RRH PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
RHY PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
RHH PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
KHH PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
KHY PWRIVVVRDPATKRALREAAFQGAHVEEAPVVLVLYADLEDAHLDEVI 100
*****

KRY HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
RRH HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
RHY HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
RHH HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
KHH HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
KHY HPGVQGERREAEQKQAIQRAFAAMGQEARAWASGQSYILLGYLLLLLEAY 150
*****

KRY GLGSVPMLGFDPERVKAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SYRLPLER 200
RRH GLGSVPMLGFDPERVRAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SHRLPLER 200
RHY GLGSVPMLGFDPERVRAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SYRLPLER 200
RHH GLGSVPMLGFDPERVRAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SHRLPLER 200
KHH GLGSVPMLGFDPERVKAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SHRLPLER 200
KHY GLGSVPMLGFDPERVKAILGLPSRAAI PALVALGYPAEEGYP SYRLPLER 200
*****

KRY VVLWR 205
RRH VVLWR 205
RHY VVLWR 205
RHH VVLWR 205
KHH VVLWR 205
KHY VVLWR 205
*****
```

Figura 5. 36. Secuencias alineadas de los diferentes mutantes múltiples de Tt27-NOX. El alineamiento se llevó a cabo usando el algoritmo ClustalW. (*) residuos idénticos; (:) residuos diferentes, en rojo. KHY: secuencia resultado del clonaje y secuenciación del producto amplificado de PCR del ADN de *T. thermophilus* HB27 del laboratorio del Prof. J. Berenguer (CBM UAM-CSIC). **KHH:** secuencia de la variante como aparece en el KEGG. **RRH:** secuencia de la NOX de *T. thermophilus* HB8 como aparece en el PDB. **RHH:** secuencia de la variante como aparece en el BacMap. **KRY** y **RHY**, otros dos mutantes estudiados.

KRY y RHY corresponden a otros dos mutantes que se construyeron para identificar otras posibles alteraciones en las propiedades de la enzima. Para caracterizar estas variantes y ver los efectos de estas mutaciones puntuales, el gen amplificado fue clonado en el vector de expresión pET-22b(+) y fue expresado en *E. coli* BL21 DE3.

5. 4. 2. Purificación de las variantes de Tt27-NOX. Caracterización de la estabilidad térmica de las variantes de Tt27-NOX solubles.

El protocolo de purificación empleado fue básicamente el mismo que se empleó anteriormente, constando éste de 3 pasos:

1. Tratamiento térmico a 80 °C durante 45 minutos. Después la suspensión fue centrifugada para descartar el precipitado.
2. El sobrenadante obtenido en el paso anterior, se incubó junto a Ag-PEI.
3. Por último, el sobrenadante obtenido del paso 2, se incubó junto a Ag-DS. Después, se recuperó el sobrenadante donde se encontraba la proteína de interés.

Este protocolo fue utilizado para la purificación de las variantes KHY, KHH y RHH. Durante la purificación de las variantes RHY, RRH y KRY mediante el protocolo estándar, algunas de estas variantes se inactivaron parcial o totalmente durante el tratamiento térmico a 80 °C. Por esta razón se estudiaron las estabildades de las enzimas solubles a 80 °C y pH 7. En la **Figura 5. 37** se puede observar como la variante KRY fue la más inestable, inactivándose completamente tras 15 minutos de incubación. La variante RHY fue la segunda variante más inestable, conservando un 35 % de la actividad inicial tras 20 minutos de incubación. Mientras que la tercera variante más inestable fue la RRH (enzima descrita por Park y col.) con una vida media de 75 minutos. Por el contrario, las variantes más estables fueron la KHH, KHY y RHH (conservaron el 90 % de la actividad inicial tras 5 horas de incubación).

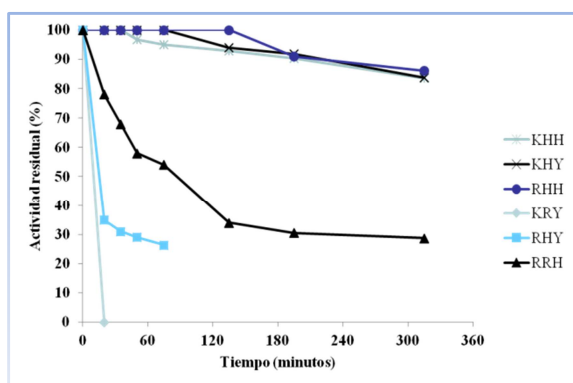


Figura 5. 37. Estabilidad de las variantes de Tt27-NOX solubles a 80 °C y pH 7. Los experimentos se llevaron a cabo en fosfato de sodio 10 mM pH 7 en condiciones saturantes de FMN. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μM FMN y 0,25 mM de NADH.

Resultados

Por tanto, para la purificación de las variantes KRY, RHY y RRH se utilizó un tratamiento térmico menos severo: incubación durante 60 minutos a 70 °C, donde se había comprobado que las enzimas conservaban prácticamente el 100 % de la actividad inicial. Además, en el caso de la variante KRY hubo otro paso diferencial con respecto al resto de variantes, que fue la no utilización del soporte Ag-DS para aumentar el factor de purificación, ya que al menos un 70 % de la enzima ofrecida se adsorbió sobre este soporte.

Al final del proceso de purificación de la variante KHH obtuvimos un factor de purificación superior a 19 y una AE mayor de 70 U/mg a 25 °C, pH 7 y en condiciones saturadas de cofactor (véase **Tabla 5. 12**).

Mutante	Factor de purificación final	AE (U/mg)
<i>KHY^a</i>	14,9	65
<i>KHH^a</i>	19,3	76
<i>RHH^a</i>	14,4	50
<i>KRY^b</i>	5,6	24
<i>RHY^c</i>	8,9	44,3
<i>RRH^c</i>	10,9	42

Tabla 5. 12. Purificación de las variantes de Tt27-NOX. ^a Purificación mediante choque térmico de 80 °C durante 45 min, incubación junto a Ag-PEI durante 1 h y posterior incubación junto a Ag-DS durante 1 h. ^b Purificación mediante choque térmico de 70 °C durante 60 min e incubación junto a Ag-PEI durante 1 h. ^c Purificación mediante choque térmico de 70 °C durante 60 min e incubación junto a Ag-PEI durante 1 h y posterior incubación junto a Ag-DS durante 1 h. Actividad determinada a 25 °C, pH 7 y 150 µM FMN.

La variante RHH se purificó sin variar el protocolo anteriormente descrito, obteniéndose una AE de 50 U/mg a 25 °C, pH 7 y en condiciones saturantes de cofactor (**Tabla 5. 12**). En la purificación de la variante KRY hubo dos variaciones al protocolo general de purificación como se ha comentado anteriormente. Por una parte, la temperatura del choque térmico se redujo a 70 °C durante 60 minutos y por otra parte se omitió el paso por el soporte Ag-DS al adsorberse 3/4 partes de la proteína de interés. Omitiendo el paso por Ag-DS, el rendimiento de la purificación fue de un 60%, con un factor de purificación mayor de 5 y una AE final de 24 U/mg a 25 °C, pH 7 y en condiciones saturadas de FMN (**Tabla 5. 12**). En el caso de las variantes RHY y RRH se utilizó el protocolo general de purificación, con la única excepción de que el choque térmico se realizó a 70 °C durante 60 minutos. Al final del proceso, obtuvimos un factor de purificación cercano a 9 y 11 respectivamente, y actividades específicas similares (**Tabla 5. 12**).

Por último, las variantes una vez purificadas fueron analizadas en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes para comprobar la eficacia de la purificación y comparar su movilidad electroforética (**Figura 5. 38**). En el carril 6 de la **Figura 5. 38** puede observarse como la variante KRY tiene afectada su movilidad electroforética en comparación con el resto de variantes.

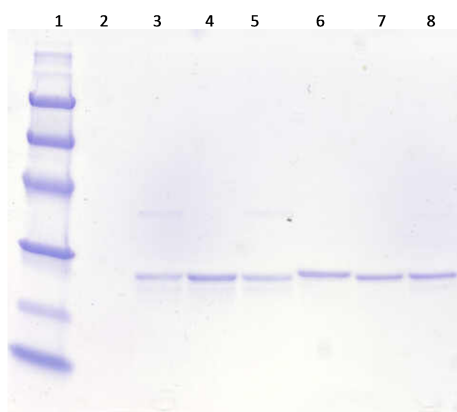


Figura 5. 38. Análisis SDS-PAGE de todas las variantes purificadas de **Tt27-NOX**. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (kDa); 3) variante KHY; 4) variante KHH; 5) variante RHH; 6) variante KRY; 7) variante RHY; 8) variante RRH.

5. 4. 3. Caracterización de las variantes de Tt27-NOX.

5. 4. 3. 1. Efecto del FAD/FMN exógeno sobre la actividad enzimática. Parámetros cinéticos.

Como hemos visto en el **apartado 5. 4. 3. 1** fue necesaria la adición de cofactor exógeno para que las diferentes variantes alcanzaran su máxima actividad catalítica. Por este motivo, se comprobó si existían diferencias entre las diferentes variantes en cuanto a la cantidad necesaria de cofactor de flavina exógeno necesario para llegar a su máxima actividad catalítica. La actividad enzimática alcanzó su máximo entre 50 μM (en el caso de la variante RRH) y 150 μM de FAD (en el caso de las variantes KHH, KHY y RHH), a excepción de la variante KRY, donde fue necesaria la adición de 300 μM de FAD para llegar a la máxima actividad. En el caso del FMN, la máxima actividad se alcanzó de nuevo entre 50 (variante KRY) y 150 μM de cofactor (variantes KHH, KHY y RHH).

Para poder tener una visión global de cómo afectaban las diferentes mutaciones a la afinidad de cada variante por cada cofactor se estudiaron los valores de K_m para el NADH, el FAD y el FMN (**Tabla 5. 13**). A la vista de los resultados obtenidos, la afinidad por el NADH no sufrió variaciones significativas a excepción de la variante RHY donde la K_m fue algo mayor ($4,6 \pm 1,12 \mu\text{M}$) en comparación con el resto de variantes. En cuanto a la afinidad por el cofactor FMN, las variantes KRY, RRH y RHY presentaron una afinidad por dicho cofactor, al menos, dos veces mayor que el resto de las variantes (**Tabla 5. 13**). Por el contrario, respecto a las diferencias de afinidad entre los dos cofactores de flavina (FMN y FAD) de una misma variante, no hubo grandes diferencias salvo en el caso de la variante KRY donde, la K_m para el FMN fue de $15,22 \pm 5,07 \mu\text{M}$ mientras que para el FAD fue de $127,3 \pm 20,5 \mu\text{M}$.

Variante/ K_m (μ M)	KHY	KHH	RHH	KRY	RHY	RRH
$K_{m\text{NADH}}^a$	$2,1 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$	$4,6 \pm 1$	$1,8 \pm 0,1$
$K_{m\text{FMN}}^b$	43 ± 5	45 ± 4	47 ± 5	15 ± 5	27 ± 5	19 ± 5
$K_{m\text{FAD}}^b$	34 ± 6	46 ± 9	29 ± 7	127 ± 20	30 ± 10	28 ± 9

Tabla 5. 13. Parámetros cinéticos de las variantes de Tt27-NOX calculados a pH 7 y 25 °C. Las actividades fueron ajustadas a una regresión no lineal. ^aParámetros cinéticos calculados para el NADH fueron calculados utilizando 50 μ M FAD. ^bParámetros cinéticos para los cofactores de flavina fueron calculados utilizando 10 μ M de NADH.

5. 4. 3. 2. Efecto de la incubación de las variantes de Tt27-NOX a altas temperaturas.

Cuando las distintas variantes fueron incubadas a altas temperaturas, 80 °C y pH 7, en condiciones limitantes de cofactor, en la variante KHH se produjo un aumento de la actividad como el descrito en el **apartado 5. 3. 3. 6**. En el caso de la variante KRY no hubo aumento de la actividad durante la incubación a 80 °C, debido posiblemente a su baja estabilidad, pero tampoco la hubo a 70 °C, donde mostró una mayor estabilidad. En los casos de las variantes RRH, RHY y RHH, el aumento de la actividad fue como máximo de dos veces y se vio rápidamente enmascarado por la inactivación de las mismas.

5. 4. 4. Inmovilización de las variantes de Tt27-NOX sobre BrCN Sepharose®.

Para poder comparar la estabilidad de las diferentes variantes en su forma pura, se procedió a inmovilizar las enzimas purificadas en BrCN Sepharose®. Tras 30 minutos de inmovilización a pH 7 y 4 °C, se inmovilizó el 100 % de la enzima ofrecida al soporte. Una vez inmovilizadas, se midió la actividad expresada de cada variante, que fue muy parecida en todos los derivados, siendo ésta de entre el 50 y 60 %.

5. 4. 4. 1. Estabilidad térmica de Tt27-NOX inmovilizada sobre BrCN Sepharose®.

Una vez inmovilizada en BrCN Sepharose®, se analizó la estabilidad térmica a 70 °C y pH 7 de la las distintas variantes (véase **Figura 5. 39**). Las variantes más estables volvieron a ser la KHY, KHH y RHH que conservaron el 100 % de la actividad inicial tras 10 horas de incubación a 70 °C y pH 7. Mientras que las variantes más inestables fueron RHY y RRH que conservaron el 50 % de su actividad tras 10 horas de incubación en las mismas condiciones.

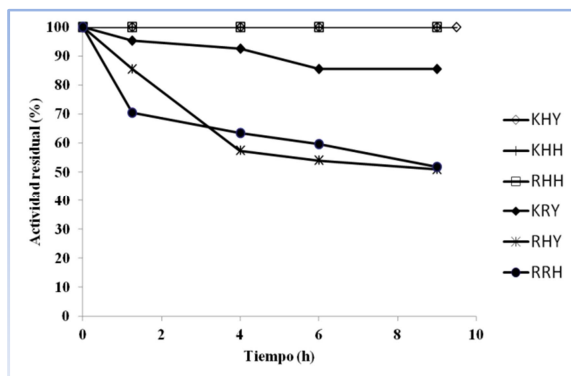


Figura 5. 39. Curso de inactivación a pH 7 y 70 °C en fosfato de sodio 10 mM de las variantes de Tt27-NOX inmovilizadas. Símbolos: (◇) BrCN Sepharose®-KHY; (+) BrCN Sepharose®-KHH; (◆) BrCN Sepharose®-KRY; (□) BrCN Sepharose®-RHH.; (*) BrCN Sepharose®-RHY; (●) BrCN Sepharose®-RRH. Experimentos realizados con enzima purificada. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

Cabe destacar, como la variante KRY mejoró notablemente su estabilidad, teniendo en cuenta que a 80 °C y pH 7, la enzima soluble se inactivaba totalmente en menos de 15 minutos. Mientras que con el simple hecho de inmovilizarla en BrCN Sepharose®, mejoró sustancialmente su estabilidad llegando a conservar más del 80 % de la actividad inicial tras 9 horas de incubación.

Con los derivados BrCN Sepharose® más estables (que fueron KHY, KHH y RHH) se estudió las posibles diferencias en cuanto a estabilidad, incubando los derivados en condiciones más drásticas (80 °C pH 5 y 9) (Figuras 5. 40, A y B).

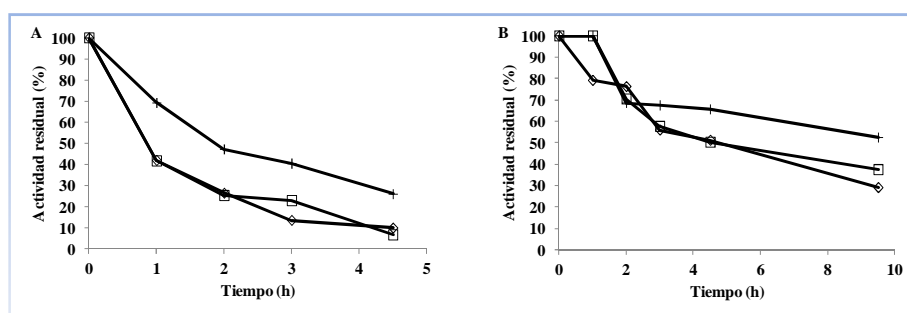


Figura 5. 40. A) Curso de inactivación a pH 5 y 80 °C en acetato de sodio 50 mM de las variantes KHY, KHH y RHH de Tt27-NOX inmovilizadas. Símbolos: (◇) BrCN Sepharose®-KHY; (+) BrCN Sepharose®-KHH; (□) BrCN Sepharose®-RHH. B) Curso de inactivación a pH 9 y 80 °C en borato de sodio 50 mM de las variantes KHY, KHH y RHH. Símbolos: (◇) BrCN Sepharose®-KHY; (+) BrCN Sepharose®-KHH; (□) BrCN Sepharose®-RHH. Experimentos realizados con la enzima purificada. Actividad enzimática determinada en 10 mM fosfato de sodio pH 7, 37 °C, 150 μ M FMN y 0,25 mM de NADH.

En estas condiciones más extremas, el derivado más estable fue la variante KHY, mientras que la estabilidad de las otras dos variantes (KHH y RHH) fue muy similar. La vida media del derivado de la variante KHY a pH 5 y 80 °C fue de 2 horas, y de unas 10 horas a 80 °C y pH 9, 2 veces más estable que los otros dos mutantes. La variante KHY fue la enzima aislada del genoma de *T. thermophilus* HB27 y que se estudió a fondo en el apartado 5. 3 de la presente Tesis Doctoral.

5. 5. SISTEMAS MULTI-ENZIMÁTICOS INMOVILIZADOS APLICADOS A OXIDACIONES SELECTIVAS Y REDUCCIONES ASIMÉTRICAS.

5. 5. 1. Procesos redox catalizados por dos biocatalizadores heterogéneos con regeneración de cofactor integrada en un solo reactor.

Para el diseño de diferentes sistemas bi-enzimáticos aplicados a diferentes reacciones redox con regeneración *in situ* del cofactor soluble, se han utilizado las DHs descritas en los apartados anteriores, con ayuda de otras DHs disponibles en el laboratorio. En este caso, los sistemas bi-enzimáticos estaban formados por dos DHs inmovilizadas por separado (es decir, cada enzima inmovilizada en una superficie porosa diferente) integradas en un mismo reactor tipo *batch*: una DH principal que catalizaba la reacción principal y una DH secundaria que regeneraba el cofactor redox.

5. 5. 1. 1. Resolución cinética del (*rac*)-1-feniletanol mediante el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.

Mediante un sistema bi-enzimático compuesto por un catalizador inmovilizado de Tt27-NOX (enzima descrita en el **apartado 5. 3** de esta Tesis) y otro catalizador inmovilizado de una alcohol deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH1) (Rocha-Martin et al., 2009) se llevó a cabo la resolución cinética de una mezcla racémica de 1-feniletanol. Los enantiómeros puros del 1-feniletanol son utilizados como precursores sintéticos quirales e intermediarios en industria farmacéutica y en química fina. Además el (*R*)-1-feniletanol es ampliamente utilizado en la industria cosmética como fragancia (Suan and Sarmidi, 2004).

Por un lado, se prepararon biocatalizadores heterogéneos y altamente estables de NOX y Tt27-ADH1 inmovilizados de forma separada en Ag-Glx como se describe en **Métodos**. El catalizador de NOX fue utilizado como enzima regeneradora de NAD^+ acoplado al catalizador heterogéneo de Tt27-ADH1. Tal como se ha descrito, la selectividad de la deshidrogenasa principal (DH principal) fue extremadamente alta y este sistema bi-enzimático fue capaz de oxidar enantioselectivamente el isómero (*S*)-1-feniletanol a acetofenona (Rocha-Martin et al., 2009), reduciendo el NAD^+ a NADH, alcanzando un 99 % de exceso enantiomérico (*e.e.*) de (*R*)-1-feniletanol con un 50 % de conversión (**Figura 5. 41**). El sistema de regeneración de cofactor permitió la adición de sólo 6,5 % mol de NAD^+ en relación con el sustrato. El número total de recambio (TTN) del NAD^+ fue 10 en cada ciclo de reacción (un mol de cofactor fue reciclado hasta 10 veces por ciclo de reacción) en las condiciones estudiadas. En términos de productividad, 1 mg de Tt27-NOX inmovilizada en Ag-Glx fue capaz de reciclar 40 μmoles of NAD^+ por hora en las condiciones estudiadas. El mismo resultado se obtuvo cuando la reacción se llevó a cabo con el derivado de Tt27-NOX reactivado.

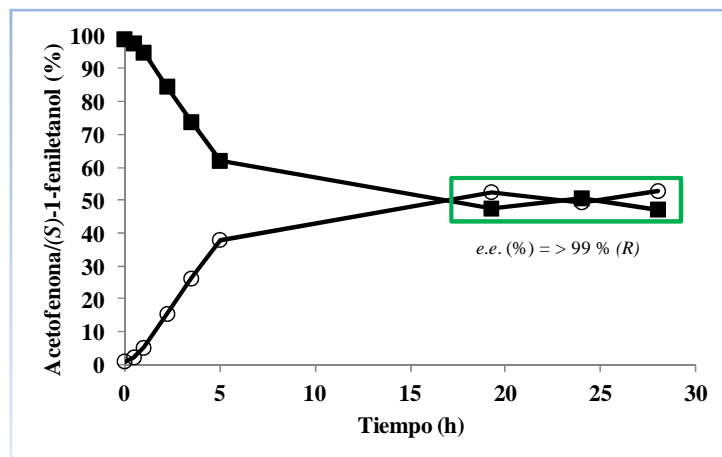


Figura 5. 41. Resolución cinética de la mezcla racémica de 1-feniletanol. Sistema bi-enzimático con regeneración *in situ* de NAD^+ consistente en 4 U de Tt27-NOX inmovilizada en Ag-Glx y 0,3 U de Tt27-ADH1 inmovilizada en Ag-Glx. La mezcla de reacción contenía 0,5 mM NAD^+ , 200 μM de FAD, 10 mM del (rac)-1-feniletanol en 10 mM de fosfato de sodio a pH 7 y 25°C. Volumen final: 10 mL. Conversión obtenida por HPLC a través de curva de calibración. El exceso enantiomérico (*e.e.*) al 50% de conversión fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos. Símbolos: (○) Acetofenona y (■) (S)-1-feniletanol.

5. 5. 1. 2. Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona catalizada por el sistema el bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH.

Debido a la capacidad del grupo trifluorometil para modificar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de compuestos orgánicos, las biotransformaciones de compuestos fluorados tienen un enorme interés en química fina (Boyd et al., 2007; Sasaki et al., 2002; Shibata et al., 2008). A partir de estos compuestos fluorados pueden sintetizarse nuevos compuestos o materiales que podrían aplicarse en diversas áreas como agroquímica, química médica, ciencia de materiales, etc. Las moléculas fluoradas tienen una mayor estabilidad metabólica, incrementando la lipofilicidad y mejorando la biodisponibilidad en comparación con otros compuestos relacionados no fluorados (Shibata et al., 2008; Singh and Shreeve, 2000).

La reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA) se llevó a cabo a pH 7 y 50 °C con el biocatalizador óptimo de Tt27-ADH2 inmovilizada en Ag-Glx y acoplado la Ps-FDH dependiente de NAD^+ inmovilizada en Ag-Glx como enzima regeneradora del cofactor reducido NADH (Bolívar et al., 2006). La **Figura 5. 42** muestra como este sistema fue capaz de llevar a cabo la reducción asimétrica de la TFA de forma cuantitativa produciendo el alcohol secundario correspondiente con un *e.e.* superior al 96 % hacia el alcohol (S)-(+)- α -(trifluorometil)bencílico. El número total de recambio (TTN) del NADH por ciclo de reacción fue 20 (un mol de cofactor fue reciclado hasta 20 veces por ciclo de reacción) en las condiciones estudiadas.

Resultados

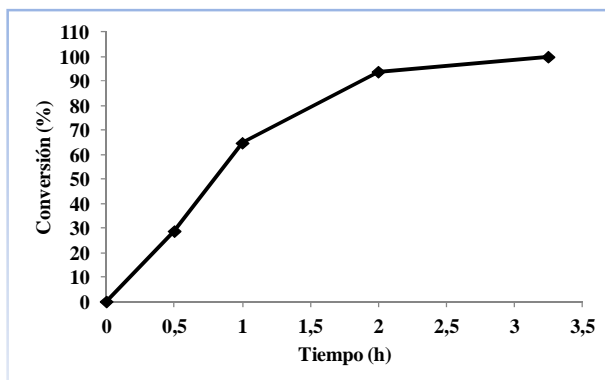


Figura 5. 42. Curso de la reacción de la reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona a (S)-(+)- α -(trifluorometil) benzil alcohol. La reducción de la TFA se llevó a cabo con un sistema de regeneración in situ de NADH. La mezcla de reacción consistió en 4 U de Ag-Glx-(Ti27-ADH2) y 8,3 U de Ag-Glx-(Ps-FDH). La mezcla de reacción contenía 0,5 mM NADH, 0,1 M de ácido fórmico, 10 mM de TFA en 50 mM de fosfato de sodio a pH 7 y 50 °C. Volumen final: 10 mL. Conversión obtenida por HPLC a través de curva de calibración. El e.e. al 100% de conversión fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos. Símbolo: (◆) alcohol (S)-(+)- α -(trifluorometil) bencílico.

El sistema descrito, además de presentar unas excelentes propiedades catalíticas, presentó una estabilidad operacional muy buena, lo que permitió su reuso durante, al menos, 4 ciclos de reacción a 30 °C sin disminuir la productividad del mismo (véase **Figura 5. 43**).

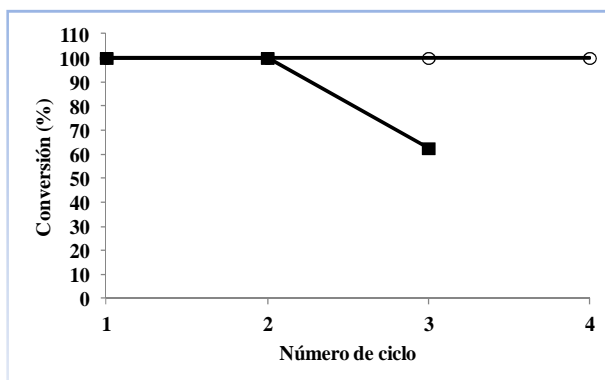


Figura 5. 43. Reuso del sistema heterogéneo bi-enzimático Ti27-ADH2/FDH en la reducción asimétrica de TFA a diferentes temperaturas. Los dos biocatalizadores heterogéneos correspondientes a cada enzima fueron separados del medio de reacción después de 3 y 24 horas de reacción a 50 (■) y 37 °C (○) a pH 7, respectivamente. Las muestras recogidas a estos tiempos de conversión fueron analizadas por HPLC. Las condiciones de reacción fueron iguales a las de la Figura 5.40.

Por otra parte, como se puede observar en la **Figura 5. 43**, cuando se reutilizaron los biocatalizadores a 50 °C, la productividad del sistema se redujo después del tercer ciclo de reuso.

5. 5. 1. 3. Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal catalizada por el sistema el bi-enzimático Tt27-ADH2/Ps-FDH.

El producto resultante de la resolución cinética dinámica del 2-fenilpropanal, el 2-fenil-1-propanol, es un importante intermediario para la síntesis de compuesto quirales útiles en distintas áreas, como química farmacéutica (derivados de profenos) y agroquímica (Galletti et al., 2010; Miyamoto et al., 2009).

Utilizando los mismos catalizadores inmovilizados de Tt27-ADH2 y Ps-FDH que en el apartado anterior, se llevó a cabo la resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal. El sistema bi-enzimático redujo cuantitativamente el aldehído a su correspondiente alcohol primario con un alto exceso enantiomérico hacia el isómero *R*, concretamente tras 3 horas de reacción a pH 7 y 50 °C, el *e.e.* fue del 71 % (véase **Figura 5. 44A**). El número total de recambio (TTN) del NADH por ciclo de reacción fue 10 en las condiciones estudiadas

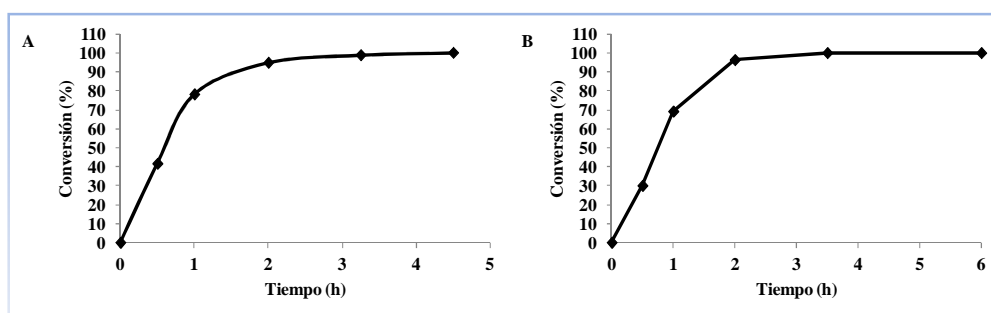


Figura 5. 44. Curso de la reacción de la resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal. (A) Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal llevada a cabo a 50 °C pH 7 con sistema de regeneración in situ de NADH. (B) Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal llevada a cabo 30 °C pH 8 con sistema de regeneración in situ de NADH. Condiciones de reacción: 2 U de Ag-Glx-(Tt27-ADH2), 4 U de Ag-Glx-(Ps-FDH), 1 mM de (*rac*)-2-fenilpropanal, 0,1 mM de NADH, 0,1 M de ácido fórmico, tampón fosfato de sodio 50 mM, Volumen total de reacción: 5 mL (A) y 10 mL (B). Conversión obtenida por HPLC a través de curva de calibración. El *e.e.* al 100% de conversión fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos.

La biorreducción cuantitativa fue posible porque los 2-arilpropanales racemizan químicamente vía equilibrio ceto-enol del aldehído de partida (Galletti et al., 2010; Giacomini et al., 2007), permitiendo que la resolución cinética sea dinámica, lográndose de este modo conversiones del 100% de sustrato, cosa que no sería posible sin la mencionada racemización química del arilpropanal.

Como ha descrito Giacomini y col. (Galletti et al., 2010), la selectividad de esta biorreducción podría puede incrementarse mediante ingeniería del medio de reacción. Giacomini y col. fueron capaces de aumentar el *e.e.* del correspondiente alcohol mediante la adición de disolvente orgánico al sistema así como incrementando el pH del mismo. Además otra ventaja de la adición de disolventes orgánicos sería el incremento de la solubilidad del arilpropanal en el medio de reacción. De este modo, nos propusimos optimizar el medio de reacción para lograr mejorar los valores de selectividad observados para esta

Resultados

reacción de reducción. Tanto la velocidad de la reacción, como la selectividad fueron estudiadas en presencia de diferentes concentraciones de disolventes orgánicos (ACN y THF) y diferentes pH (7 y 8).

Como puede observarse en las entradas 1 y 2 de la **Tabla 5. 14**, en las reacciones llevadas a cabo sin la presencia de disolventes, hubo una conversión prácticamente total del sustrato y un *e.e.* máximo del 80 % para la reacción llevada a cabo a pH 7 y 30 °C, y del 82 % para la reacción llevada a cabo en las mismas condiciones pero a pH 8 (véase **Figura 5. 44B**), siempre hacia el enantiómero *R*, y en poco más de 2 horas. Los mejores resultados se obtuvieron en presencia de entre 5-15 % de ACN (entradas de 3 a 7), donde la velocidad de la reacción fue menor a medida que aumentaba la concentración de ACN, pero obteniéndose un 100 % de conversión y unos excesos enantioméricos cercanos al 90 %.

Cuando la reacción se llevó a cabo a pH 8 sin disolvente o en presencia de baja concentración de ACN, aumentó la velocidad de la reacción (**Tabla 5. 14**) lo que permitió disminuir la temperatura de la reacción sin que se viera afectada la productividad del sistema (**Figura 5. 44A y B**). Por el contrario, cuando se utilizó THF como disolvente, a medida que aumentábamos la concentración del mismo, la velocidad de la reacción fue disminuyendo y el *e.e.* fue cada vez menor. Por ejemplo, en la entrada 12 de la **Tabla 5. 14**, la reacción con un 15 % de THF necesitó prolongarse hasta las 21 horas para alcanzar una conversión del 99% y el *e.e.* fue de tan sólo el 59 % hacia el enantiómero *R*.

Entrada	Disolvente	Disolvente (%)	pH	Tiempo (h)	Velocidad inicial reacción (μmol/min)	Conversión (%)	<i>e.e.</i> (%) (<i>R</i>)
1	ninguno	0	7	2	55,5	99	80
2	ninguno	0	8	2	87,4	99	84
3	ACN	5	7	3	42,6	100	85
4	ACN	5	8	3	50,62	100	89
5	ACN	10	7	6	41,2	100	86
6	ACN	10	8	6	43,2	100	88
7	ACN	15	8	6	24,8	100	87
8	THF	5	7	3	45,6	100	73
9	THF	5	8	3	46,2	100	73
10	THF	10	7	3,5	28,4	99	71
11	THF	10	8	6	26,8	99	69
12	THF	15	8	21	14,6	99	59

Tabla 5. 14. Resolución cinética dinámica del 2-fenilpropanal con regeneración in situ de NADH llevada a cabo por el sistema bi-enzimático Ti27-ADH2/Ps-FDH. Condiciones de reacción: 1 mM de (rac)-2-fenilpropanal, 0,1 mM de NADH, 0,1 M de ácido fórmico, tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7, 30 °C, 4 U de Ag-Glx-(Ps-FDH) y 2 U de Ag-Glx-(Ti27-ADH2). Volumen total de reacción: 10 mL. Conversión obtenida por HPLC a través de curva de calibración. El *e.e.* fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos. *e.e.* (%) (*R*) es el exceso enantiomérico hacia el enantiómero *R*.

Finalmente, se estudió si la enantioselectividad variaba durante el tiempo de reacción en presencia o no de disolventes orgánicos y bajo condiciones de pH 7 u 8.

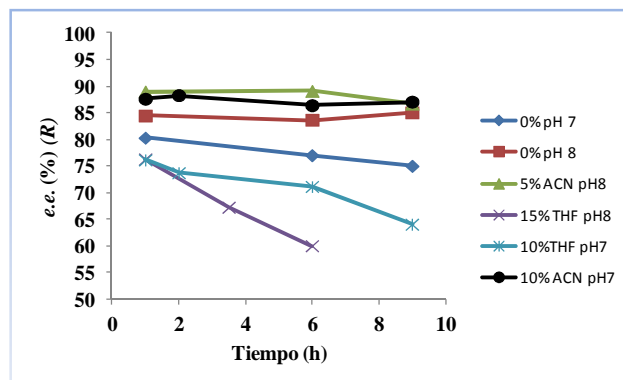


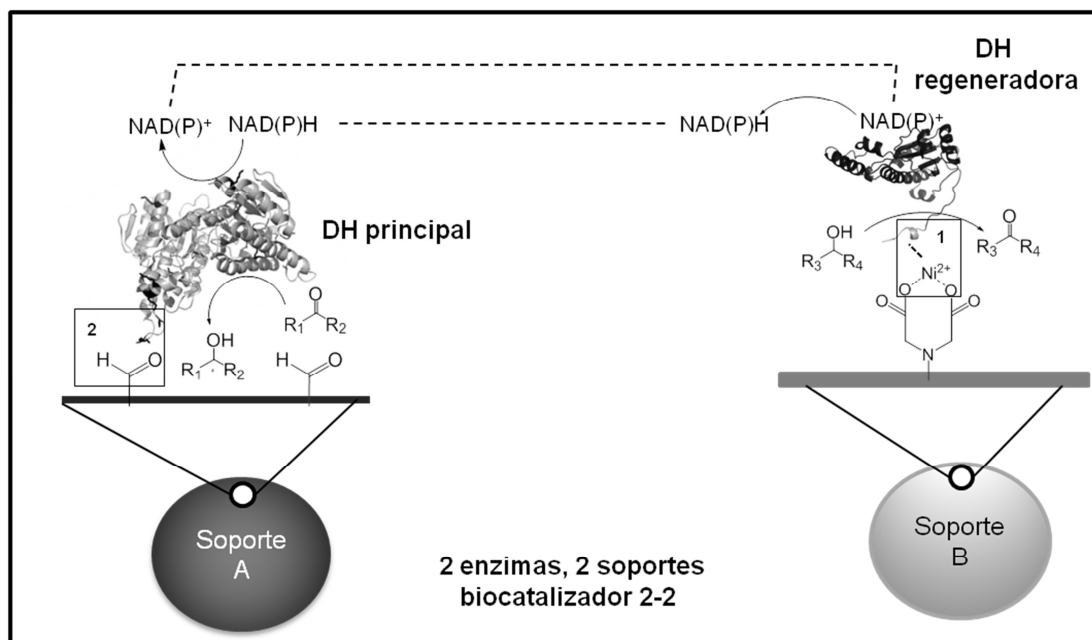
Figura 5. 45. Efecto del pH y disolventes orgánicos en la enantioselectividad durante el curso de la reacción de reducción del (rac)-2-fenilpropanal por el sistema bi-enzimático Ti27-ADH2/Ps-FDH. Símbolos: (■) 0 % de disolvente pH 8; (◆) 0 % de disolvente pH 7; (▲) 5 % de ACN pH 8; (●) 10 % ACN pH 7; (✱) 10 % THF pH 7; (✕) 15 % THF pH 8. La reducción del (rac)-2-fenilpropanal se llevó a cabo con un sistema de regeneración *in situ* de NADH. Condiciones de reacción: 1 mM de 2-fenilpropanal, 0,1 mM de NADH, 0,1 M de ácido fórmico, tampón fosfato de sodio 50 mM, 30 °C, 4 U de Ag-Glx-(Ps-FDH) y 2 U de Ag-Glx-(Ti27-ADH2). Volumen total de reacción: 10 mL. El e.e. al fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos. e.e (%) (R) es el exceso enantiomérico hacia el enantiómero R.

Como se puede observar en la **Figura 5. 45**, el e.e. hacia el enantiómero R durante el curso de la reacción a pH 7 y sin presencia de disolventes fue disminuyendo a medida que se prolongaba el tiempo de reacción. A pH 8 sin disolventes el e.e fue más estable que a pH 7. A medida que se aumentó la concentración de THF, los valores de e.e fueron disminuyendo según se prolongaba la reacción en el tiempo. Fue en presencia de ACN donde se obtuvieron valores de e.e. próximos al 90 %.

5. 5. 2. Co-inmovilización racional de sistemas bi-enzimáticos en soportes porosos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración *in situ* del cofactor soluble.

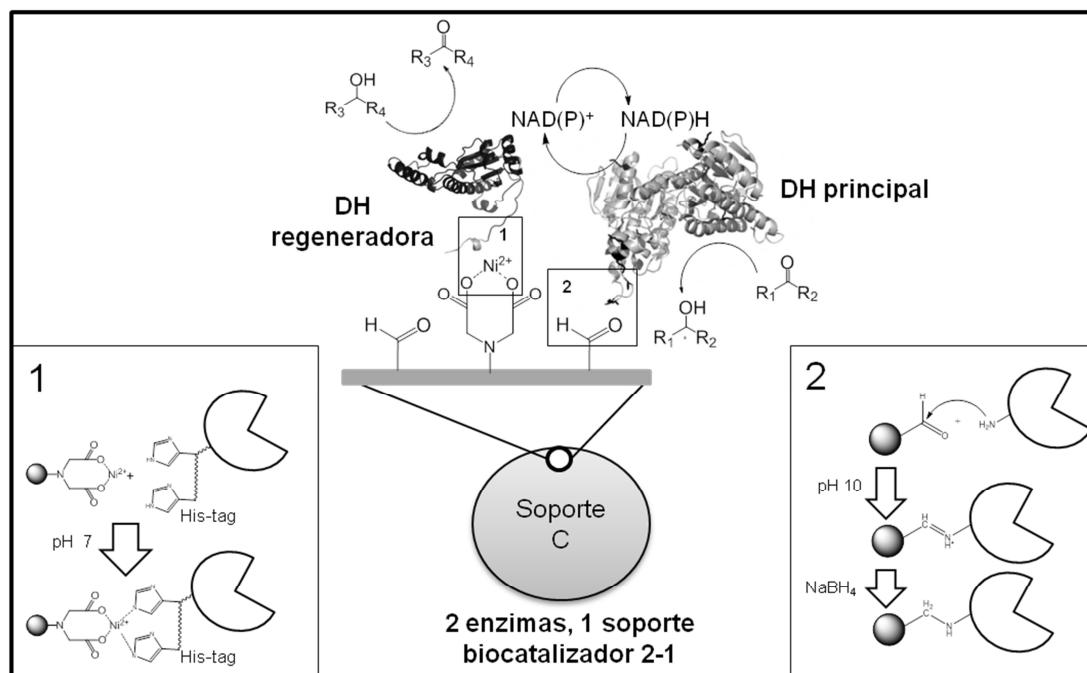
Como se mencionó anteriormente, se han diseñado diferentes sistemas bi-enzimáticos, constituidos por las DHs descritas en esta Tesis Doctoral y otras disponibles en el laboratorio, que han sido aplicados a diferentes reacciones redox. Estos sistemas estaban formados por dos DHs: una principal que catalizaba la reacción principal y una DH secundaria que regeneraba el cofactor redox.

En estos estudios, los sistemas bi-enzimáticos también se integraron en un único reactor tipo *batch*, pero además de estudiar sistemas bi-enzimáticos formados por enzimas inmovilizadas por separado (es decir, cada enzima inmovilizada en una superficie porosa diferente) (en lo sucesivo **biocatalizador 2-2**) (véase **Esquema 5. 1**), también se estudiaron sistemas bi-enzimáticos formados por enzimas co-inmovilizadas en de la misma superficie porosa (en lo sucesivo **biocatalizador 2-1**) (véase **Esquema 5. 2**).



Esquema 5. 1. Estrategias diferentes de inmovilizar sistemas bi-enzimáticos para reacciones bio-redox. En este esquema se representa la inmovilización por separado de ambas DHs en dos soportes porosos diferentes dando lugar a un biocatalizador sólido formado por dos enzimas inmovilizadas en dos superficies porosas diferentes (soportes A y B) activadas con grupos funcionales distintos (biocatalizador 2-2). En los recuadros 1 y 2 se representan dos ejemplos de dos químicas de inmovilización utilizadas para inmovilizar dos DHs.

En estos estudios se co-inmovilizaron tres sistemas bi-enzimáticos usando diferentes químicas de co-inmovilización en base a los rendimientos de inmovilización y de actividad expresada de cada una de las dos enzimas que formaban el sistema. La matriz de inmovilización utilizada en estos experimentos fue agarosa heterofuncionalmente activada (siempre que fue posible) con grupos glioxil y otros grupos funcionales (Mateo et al., 2010). Sin embargo, como veremos más adelante, el protocolo de inmovilización no fue universal para todos los sistemas bi-enzimáticos co-inmovilizados.



Esquema 5. 2. Diferentes estrategias de inmovilización de sistemas bi-enzimáticos para reacciones bio-redox. En este esquema, ambas DHs son co-inmovilizadas en la misma superficie porosa (soporte C) heterofuncionalmente activada dando lugar a un biocatalizador formado por dos enzimas en la misma superficie porosa (biocatalizador 2-1). En los recuadros 1 y 2 se representan dos ejemplos de dos químicas de inmovilización utilizadas para inmovilizar dos DHs. Con más detalle, en el recuadro 1 se representa la coordinación química entre la cola de poliHis de la proteína y los grupos quelatos metálicos de la superficie del soporte. En el recuadro 2, se representa el enlace covalente entre ϵ -NH₂ de residuos Lys de la proteína y los grupos glioxil de la superficie del soporte. En este esquema solo se representa el reciclaje del cofactor reducido pero puede ser extendido al reciclaje del cofactor oxidado. Además, sólo se muestra dos químicas diferentes de inmovilización pero pueden ser otras químicas según los requerimientos de sistemas bi-enzimáticos.

5. 5. 2. 1. Co-inmovilización de diferentes sistemas bi-enzimáticos para el reciclaje de cofactores redox.

El primer sistema redox estudiado (**Sistema A**), consistió en la regeneración de NADPH aplicada a la resolución cinética dinámica de 2-fenilpropanal (**1a**) para dar preferentemente (*S*)-(-)-2-fenil-1-propanol (**1b**), que es utilizado como precursor en la síntesis de derivados de profenos, que son fármacos con propiedades anti-inflamatorias (Friest et al., 2010; Galletti et al., 2010) (**Figura 5. 46**).

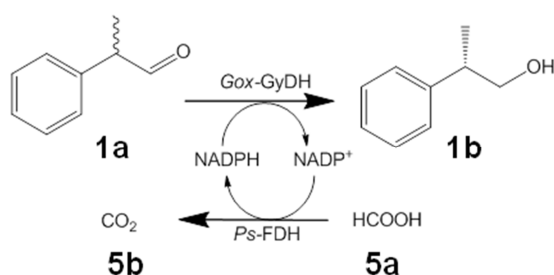
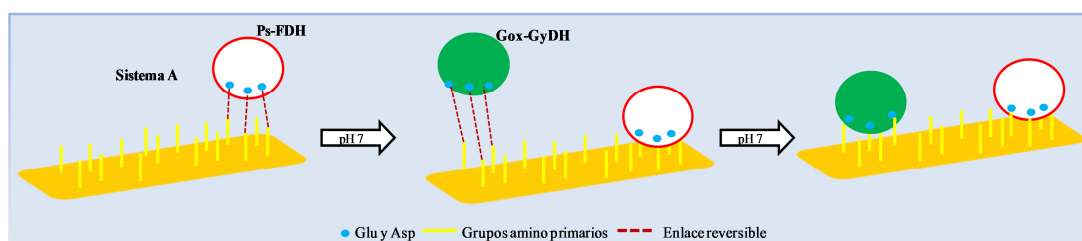


Figura 5. 46. Sistema redox bi-enzimático A.

Resultados

En este caso, la glicerol deshidrogenasa de *Gluconobacter oxidans* (Gox-GyDH) fue utilizada como DH principal y la formiato deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.* (Ps-FDH) como DH regeneradora. Cabe destacar, que en este caso la Ps-FDH utilizada era dependiente de NADP^+ para poder regenerar el NADPH consumido por la Gox-GyDH. Como ninguna de las dos enzimas contenía una cola de poliHis, se descartó inmovilizar las dos DHs sobre el soporte heterofuncional Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx. Por este motivo, se intentó inmovilizar este sistema en otro soporte heterofuncional activado con grupos glioxil y grupos aminos (Ag-A-Glx). En este soporte, la Gox-GyDH fue inmovilizada con un 44 % de rendimiento de inmovilización (Ψ), pero no expresó actividad. Por tanto, este soporte también fue descartado al promover la inactivación de la Gox-GyDH.



Esquema 5. 3. Estrategia de inmovilización del Sistema redox bi-enzimático A. Las dos DHs fueron inmovilizadas en agarosa activada con grupos amino primarios (Ag-MANAE).

Como alternativa, ambas enzimas fueron secuencialmente co-inmovilizadas en un soporte monofuncional de agarosa activada con grupos amino primarios (Ag-MANAE) (véase **Esquema 5. 3**). En este soporte monofuncional, la Gox-GyDH fue inmovilizada con un rendimiento de inmovilización del 44 %, expresando el 36 % de actividad inmovilizada (véase **Tabla 5. 15**). La Ps-FDH también fue inmovilizada en Ag-MANAE con un rendimiento de inmovilización del 100 % y un 82 % de actividad expresada. Por lo tanto, ambas enzimas se inmovilizaron secuencialmente en el soporte Ag-MANAE, primero la Gox-GyDH y después la Ps-FDH, mediante la misma química de inmovilización.

Los biocatalizadores heterogéneos fueron hervidos en tampón de ruptura de Laemmli (Laemmli, 1970). Bajo estas condiciones cualquier proteína no unida covalentemente al soporte se liberaría al sobrenadante. De este modo, se analizaron las muestras de los sobrenadantes en geles de poliacrilamida al 12 % mediante SDS-PAGE y después fueron teñidos con azul de Coomassie. Como se puede observar en el carril 10 de la **Figura 5. 50**, la co-inmovilización fue reversible para ambas enzimas, ya que las dos enzimas liberaron subunidades en condiciones desnaturalizantes.

La resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal, se realizó mediante un biocatalizador de Gox-GyDH y Ps-FDH dependiente de NADP^+ co-inmovilizado conjuntamente en Ag-MANAE (biocatalizador tipo 2-1).

La Gox-GyDH catalizó la reducción asimétrica del (*rac*)-2-fenilpropanal para producir (*S*)-(-)-2-fenil-1-propanol con un *e.e.* del 84% hacia el enantiómero *S* y una conversión del 100 % (**Figura 5. 47**) a 30 °C y pH 7. La reacción se llevó a cabo en presencia de un 5 % de 2-propanol para aumentar la solubilidad del sustrato en el medio de reacción. La biorreducción cuantitativa fue posible ya que los 2-arilpropanales racemizan químicamente vía equilibrio ceto-enol del aldehído de partida (Galletti et al., 2010) permitiendo que la resolución cinética sea dinámica, lográndose de este modo conversiones del 100% de sustrato. El TTN por ciclo de reacción del NADPH fue 200 (un mol de cofactor fue reciclado hasta 200 veces por ciclo de reacción) en las condiciones aquí estudiadas.

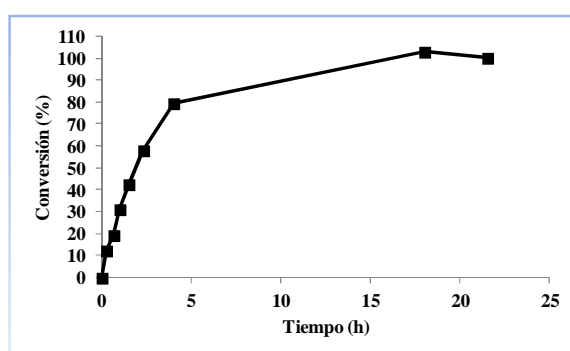


Figura 5. 47. Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal por biocatalizador co-inmovilizados de Gox-GyDH y Ps-FDH (**Sistema A**). Condiciones de reacción: 1 mM de 2-*rac*-fenilpropionaldehído fueron reducidos por un biocatalizador cargado con 1 U de Ps-FDH y 0,57 U de Gox-GyDH, con 0,005 mM de NADPH y 0.1 M de ácido fórmico a 30 °C y pH 7. Volumen total de reacción: 5 mL. Conversión obtenida por HPLC a través de curva de calibración. El *e.e.* fue determinado por HPLC quiral como se describe en métodos.

El segundo sistema estudiado (**Sistema B**) consistió en la regeneración de NAD^+ aplicada a la oxidación selectiva de glicerol (**7a**) para producir dihidroxiacetona (DHA) (**7b**). Esta molécula es un importante precursor sintético en química fina (Enders et al., 2005) además de un producto de alto valor en la industria cosmética (Pantini et al., 2007) (**Figura 5. 48**).

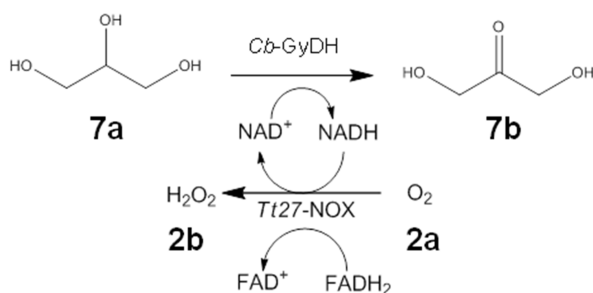


Figura 5. 48. Sistema redox bi-enzimático B.

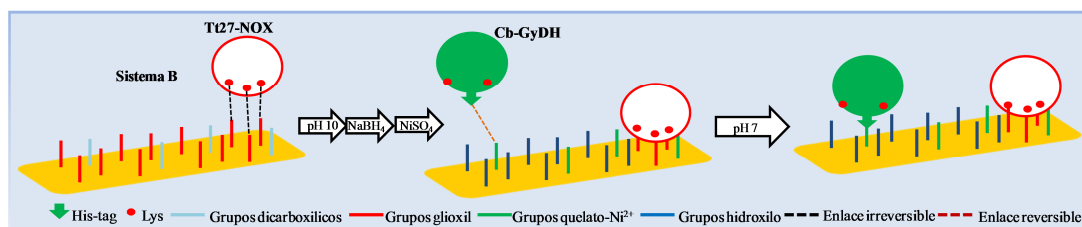
Resultados

Sistema de regeneración de NADPH (Sistema A)				
	<i>DH principal</i>		<i>DH regeneradora</i>	
Soporte	Gox-GyDH		Ps-FDH	
	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]
Ag-MANAE	44	1,24(36)	100	2,13(82)
Ag-A-Glx	44	0(0)	Nd	Nd
Sistema de regeneración de NAD ⁺ (Sistema B)				
	<i>DH principal</i>		<i>DH regeneradora</i>	
Soporte	Cb-GyDH		Tt27-NOX	
	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]
Ag-IDA-Ni ²⁺ -Glx	100	0(0)	100	1,84 (20)
Ag-IDA-Ni ²⁺ -Glx	100	2,53(32)	100	1,84(20)
Sistema de regeneración de NADH (Sistema C)				
	<i>DH principal</i>		<i>DH regeneradora</i>	
Soporte	Tt27-ADH2		Tt27-GDH	
	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]	Ψ (%) ^[a]	Ae [U/g](%) ^[b]
Ag-IDA-Ni ²⁺ -Glx	100	0,99 (72)	100	2,7 (69)
Ag-IDA-Ni ²⁺ -Glx ^[c] + 0,2 M Imidazol	100	1,14 (60)	100	2,7 (67)

Tabla 5. 15. Parámetros de inmovilización de los 3 sistemas bi-enzimáticos estudiados. ^[a].- Ψ (rendimiento de inmovilización)= 100-((Actividad sobrenadante/Actividad blanco)*100). ^[b].-Ae (actividad expresada) (%)= (Actividad expresada (U/g)/Actividad inmovilizada (U/g))*100. ^[c].-En estos experimentos la Tt27-GDH fue inmovilizada en presencia de 0,2 M de imidazol, después se filtró el derivado y se resuspendió con la disolución de Tt27-NOX en 0,1M de carbonato de sodio a pH 10,05. Nd: inmovilización no llevada a cabo.

En este sistema se utilizó una glicerol deshidrogenasa de *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH) y una NADH oxidasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-NOX) que oxidaría el NADH formado a NAD⁺ utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (enzima descrita en el **apartado 5. 3**). La DH principal (Cb-GyDH) fue inmovilizada en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx mediante un mecanismo en dos pasos: 1º) una primera incubación a pH 7 donde la enzima se uniría de forma reversible a los grupos quelato metálicos del soporte a través de la cola de His introducidas mediante ingeniería genética en su amino terminal, y 2º) una incubación a pH alcalino donde la enzima ya adsorbida al soporte sería capaz de unirse covalentemente al soporte gracias a la interacción multipuntual entre los grupos amino de las Lys superficiales de la enzima y los grupos glioxiles del soporte. Este protocolo de inmovilización resultó totalmente inactivante para esta enzima, concretamente fue en la segunda etapa donde la Cb-GyDH perdió toda su actividad. La solución fue inmovilizar primero la enzima regeneradora (Tt27-NOX) a través de los grupos glioxil del soporte en condiciones alcalinas, para posteriormente inmovilizar la enzima principal (Cb-GyDH) en condiciones de pH 7 a través de su etiqueta de 6 His vía química IMAC (véase **Esquema 5. 4**).

Esta secuencia de inmovilización solamente fue posible mediante la inmovilización de Tt27-NOX a pH 10 en condiciones de alta fuerza iónica a un soporte Ag-IDA-Glx. De este modo, la enzima regeneradora, (Tt27-NOX) fue inmovilizada a través de los grupos glioxiles del soporte y posteriormente el derivado se redujo con NaBH₄ para estabilizar las bases de Schiff formadas entre los grupos glioxil del soporte y las lisinas superficiales de la enzima. Además, el paso de reducción eliminó los grupos glioxil residuales convirtiéndolos en grupos hidroxilos. Después, el derivado reducido de Tt27-NOX fue incubado con NiSO₄ para formar los quelatos metálicos junto con los ácidos di-carboxílicos remanentes de la superficie del soporte. En este paso, la actividad de la Tt27-NOX no se vio afectada por la incubación con la sal metálica. Una vez que el soporte fue activado con los quelatos Ni²⁺ se procedió a inmovilizar la Cb-GyDH a pH 7. Mediante este protocolo de inmovilización, se previno la inactivación de la enzima al no quedar grupos glioxil en la superficie del soporte (**Esquema 5. 4**).



Esquema 5. 4. Estrategia de inmovilización del Sistema redox bi-enzimático B. Las dos DHs fueron inmovilizadas en agarosa activada con grupos glioxiles y quelatos metálicos (Ag-IDA-Ni²⁺-Glx). La Tt27-NOX se inmovilizó a pH 10 a través de los grupos glioxil del soporte, tras la reducción con NaBH₄ y activación del soporte con Ni²⁺ se inmovilizó la Cb-GyDH a pH 7.

De este modo la Cb-GyDH se inmovilizó con un 100 % de rendimiento de inmovilización y una actividad expresada de algo más del 30 % y la Tt27-NOX expresó un 20% de la actividad inmovilizada con un 100 % de rendimiento de inmovilización (**Tabla 5. 15**). Como se puede observar en el análisis del derivado resultante mediante SDS-PAGE, la enzima regeneradora fue inmovilizada irreversiblemente al soporte, mientras que las subunidades de la Cb-GyDH fueron liberadas en condiciones desnaturalizantes (**Figura 5. 50**).

El tercer sistema (**Sistema C**) se aplicó a la biorreducción asimétrica de 2,2',2''-trifluoroacetophenona (**3a**) para producir el alcohol (*R*)- α -(trifluorometil)benílico acoplado a un sistema de regeneración de NADH. La reacción principal fue catalizada por una alcohol deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH2) (enzima descrita en el **apartado 5. 1** de esta Tesis) mientras que la regeneración del NADH fue llevado a cabo por una glutamato deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-GDH) (Bolívar et al., 2008) utilizando L-glutamato (**4a**) como sustrato (**Figura 5. 49**).

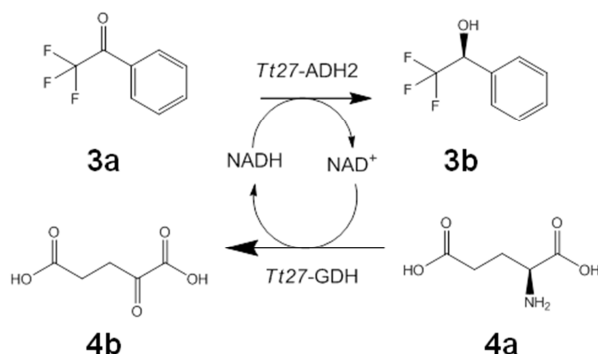
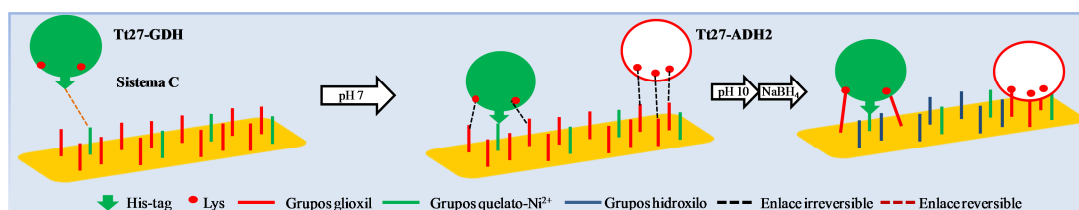


Figura 5. 49. Sistema C.

Ambas enzimas fueron co-inmovilizadas en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx como el sistema B pero en diferente secuencia de inmovilización (véase **Esquema 5. 5**). Primero la Tt27-GDH fue inmovilizada, a pH 7 a través de las colas de poliHis sobre el soporte a través de los grupos quelatos-Ni²⁺, y después la DH principal (Tt27-ADH2) fue inmovilizada covalentemente a través de los grupos glioxil en condiciones alcalinas (**Esquema 5. 5**).



Esquema 5. 5. Protocolo de inmovilización del Sistema C. Las dos DHs fueron inmovilizadas en agarosa activada con grupos glioxiles y quelatos metálicos (Ag-IDA-Ni²⁺-Glx).

El rendimiento de inmovilización para Tt27-ADH2 y Tt27-GDH en el soporte Ag-IDA-Ni²⁺-Glx fue del 100 %, expresando más del 60% de la actividad inmovilizada (véase **Tabla 5. 15**). En el carril 4 de la **Figura 5. 50** puede observarse como las dos subunidades de la Tt27-ADH2 se unieron covalentemente al soporte (estructura cuaternaria estabilizada), mientras que algunos monómeros de la Tt27-GDH no se involucraron en la unión covalente de la enzima al soporte.

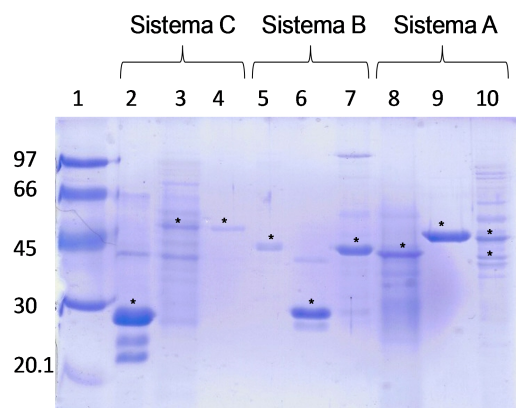


Figura 5. 50. Análisis mediante SDS-PAGE de la unión reversible o irreversible de las enzimas a los soportes de los sistemas bi-enzimáticos estudiados mediante diferentes estrategias de inmovilización. Las diferentes enzimas involucradas en los diferentes sistemas aparecen marcadas con un asterisco. Carriles: 1) Marcadores de peso molecular (kDa); 2) Tt27-ADH2 soluble; 3) Tt27-GDH soluble; 4) Tt27-ADH2 y Tt27-GDH covalentemente co-inmovilizada en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx; 5) Cb-GyDH soluble; 6) Tt27-NOX soluble; 7) Cb-GyDH y Tt27-NOX reversible e irreversiblemente co-inmovilizadas en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx respectivamente; 8) Gox-GyDH soluble; 9) Ps-FDH soluble; 10) Gox-GyDH y Ps-FDH reversiblemente inmovilizada por intercambio iónico en Ag-MANAE.

5. 5. 2. 2. Efecto de la co-inmovilización en la eficiencia oxidorreductora de los sistemas bi-enzimáticos.

La eficiencia en el reciclaje del cofactor redox fue analizada en los tres sistemas descritos anteriormente comparando el biocatalizador 2-2 y el biocatalizador 2-1 (**Esquema 5. 1** y **5. 2**). En condiciones donde la concentración del cofactor redox fue muy baja, el biocatalizador co-inmovilizado 2-1 presentó una mayor frecuencia total de recambio (TOF) (TTN/h) del correspondiente cofactor redox que el biocatalizador 2-2 (**Figura 5. 51**). En cuanto a los valores de K_m aparente de las DHs principales co-inmovilizadas del modo 2-1, éstos fueron más bajos que la K_m real de la enzima soluble sin sistema de regeneración (**Tabla 5. 16**).

Sistema (DH principal)	K_m (mM)		
	Soluble	Co-inmovilizado (1 biocatalizador)	Separado (2 biocatalizadores)
Sistema de regeneración de NADPH (Sistema A) (Gox-GyDH)	0,04 ^[a]	0,015±0.006	0,04±0.001
Sistema de regeneración de NAD ⁺ (Sistema B) (Cb-GyDH)	0,057 ^[b]	0,024±0.01	0,293±0.06
Sistema de regeneración de NADH (Sistema C) (Tt27-ADH2)	0,0115 ^[c]	0,004±0.001	0,07±0.04

Tabla 5. 16. K_m real y aparente de la deshidrogenasa principal soluble e inmovilizada hacia el correspondiente cofactor redox. ^[a] (Richter et al., 2009). ^[b] (Daniel et al., 1995). ^[c] (Rocha-Martín et al., 2012).

Resultados

Por el contrario, el biocatalizador 2-2, las DH principales mostraron valores de K_m similares (sistema A) o mucho mayores (sistema B y C) que los de la enzima soluble. Sin embargo, aunque la co-inmovilización de la DH regeneradora y la DH principal mejoró en todos los casos la eficiencia del reciclaje del cofactor redox, las mejoras fueron mayores o menores dependiendo del sistema. Por ejemplo, en el sistema A, las diferencias en el TTN/h entre el biocatalizador 2-1 y 2-2 (2,8 veces en favor del biocatalizador 2-1) (véase **Figura 5. 51**) fueron las más pequeñas encontradas en estos experimentos. Mientras que los valores de TTN/h del biocatalizador 2-2 fueron lo más altos de los tres sistemas estudiados (**Figura 5. 51**).

Por otra parte, la regeneración de NAD^+ (sistema B) fue bastante ineficiente aunque el biocatalizador 2-1 fue capaz de incrementar 4,75 veces el TTN/h con respecto al biocatalizador 2-2 bajo concentraciones muy limitantes de cofactor (**Figura 5. 51B**). Además, el valor de K_m aparente de la Cb-GyDH co-inmovilizada con su regeneradora fue 12 veces más bajo que la K_m del biocatalizador 2-2 y 2 veces menor que la de la enzima soluble (**Tabla 5. 16**).

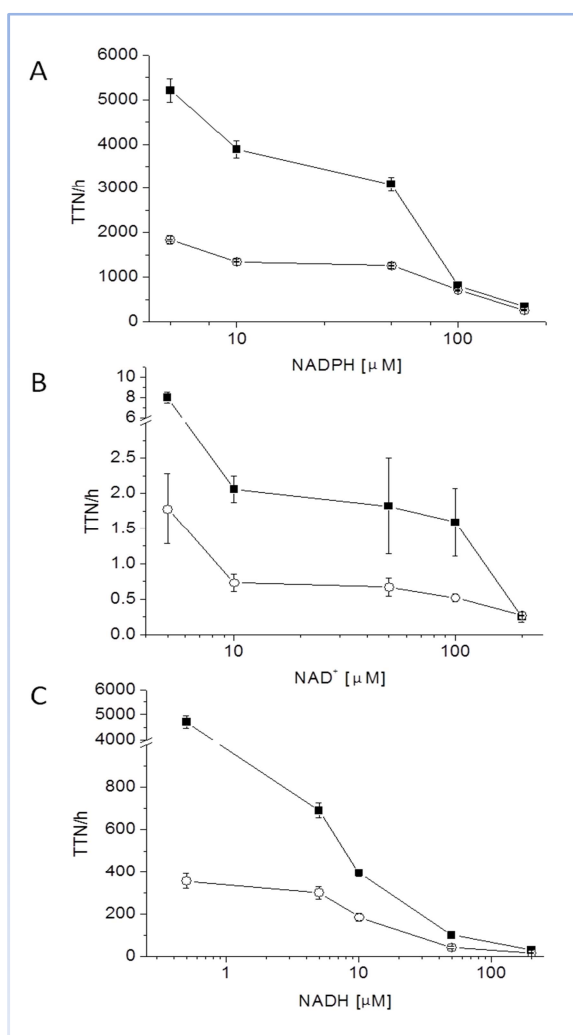


Figura 5. 51. Eficiencia de la regeneración del cofactor de los tres sistemas bio-redox catalizados por diferentes biocatalizadores bi-enzimáticos inmovilizados. (A) Sistema A: sistema de regeneración de NADPH. (B) Sistema B: sistema de regeneración de NAD^+ . (C) Sistema C: sistema de regeneración de NADH. Se utilizaron dos tipos de biocatalizadores: las dos DHs inmovilizadas por separado (biocatalizador 2-2) (○) y las dos DHs co-inmovilizadas en el mismo soporte (biocatalizador 2-1) (■). Análisis realizados con las mismas proporciones DH principal/DH regeneradora en cada sistema: sistema A 1,75; sistema B 2,75; y sistema C 1,1. Se muestra en el eje Y el número total de recambio por hora (TTN/h) y en el eje X se representa diferentes concentraciones de cofactor con el que fueron iniciadas las reacciones. Condiciones de reacción: sistema A a pH 7 y 30 °C; sistema B a 25 °C pH 7; y sistema C 55 °C pH 8 (véase Métodos).

Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron con el sistema C, donde la co-inmovilización de las dos enzimas (biocatalizador 2-1) mejoró 13 veces la regeneración del NADH con respecto al biocatalizador 2-2 (**Figura 5. 51C**). Tales resultados fueron obtenidos con concentraciones de NADH tan bajas como 0,5 μM (50 microequivalentes de cofactor por equivalente de sustrato). En este escenario, la Tt27-ADH2 co-inmovilizada con la Tt27-GDH en Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx (biocatalizador 2-1) tuvo una K_m por el cofactor 17,5 veces mayor que cuando la DH principal fue inmovilizada por separado (biocatalizador 2-2). Además cabe destacar que la co-inmovilización de la DH principal y la regeneradora para este sistema, supuso un aumento de casi 3 veces en el valor de K_m aparente para DH principal co-inmovilizada respecto a la enzima soluble. Por tanto, además de la mayor eficiencia regeneradora, la velocidad inicial de las reacciones fue mayor en las reacciones llevadas a cabo por los biocatalizadores del tipo 2-1 que en las reacciones catalizadas por biocatalizadores del tipo 2-2.

5. 5. 2. 3. Efecto de la localización espacial de cada una de las deshidrogenasas a lo largo de la superficie porosa en la eficiencia de la regeneración in-situ del cofactor.

La localización espacial de cada proteína que forma parte del sistema bio-redox a lo largo de la superficie porosa de las partículas de agarosa podría tener un impacto en la eficiencia de la regeneración del cofactor redox. Con el fin de estudiar este efecto, se marcaron las dos enzimas que componían el sistema C por su extremo N-terminal con dos sondas fluorescentes diferentes, la Tt27-ADH2 se marcó con fluorescamina (fluorescencia verde) y la Tt27-GDH se marcó con rodamina B (fluorescencia roja). Las dos proteínas marcadas se co-inmovilizaron (biocatalizador 2-1) e inmovilizaron por separado (biocatalizador 2-2) en Ag- Ni^{2+} -Glx y se analizaron por microscopía láser confocal de barrido (CLMS). En el caso de los biocatalizadores 2-2, las dos enzimas inmovilizados por separado se mezclaron y se estudiaron como un sólo biocatalizador heterogéneo bi-enzimático que fue analizado por CLMS, confirmando que ambas enzimas fueron inmovilizadas en diferentes partículas de agarosa (**Figura 5. 52**).

Por el contrario, cuando ambas proteínas fueron co-inmovilizadas en el mismo soporte, se localizaron en la misma partícula, sin embargo se distribuyeron a lo largo de la misma de forma diferente (**Figura 5. 52B**). Tt27-GDH presentó una distribución heterogénea, principalmente localizándose en la parte más superficial de la superficie porosa, mientras que la Tt27-ADH2 estaba distribuida de forma homogénea a través de toda la superficie de la partícula porosa. Esta distribución diferencial podría no ser todo lo óptima que se desearía, puesto que solamente una pequeña parte de las moléculas de enzima principal (verde) estarían rodeadas de moléculas regeneradoras vecinas (rojo).

Recientemente, se ha descrito como se puede controlar la distribución de dos proteínas distintas en el interior de superficies porosas, mediante el control de sus correspondientes velocidades de inmovilización (Bolívar et al., 2011a). De este modo, se determinó la velocidad de inmovilización de la Tt27-GDH y de la Tt27-ADH2 durante el proceso de co-inmovilización en Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx.

En estos experimentos se observó como la Tt27-GDH se inmovilizaba rápidamente a través de los grupos quelatos metálicos (100 % de inmovilización en menos de 15 minutos) mientras que la Tt27-ADH2 se inmovilizaba más lentamente a través de la química del glioxil (100 % de inmovilización en 24 horas). Por tanto, con el objetivo de que las dos enzimas co-localizaran en la misma superficie y de este modo lograran que todas las moléculas de enzima principal estuviesen rodeadas de moléculas de enzimas regeneradoras, se propuso ralentizar la velocidad de inmovilización de la Tt27-GDH para lograr una distribución más homogénea a lo largo de la superficie porosa. Se ha descrito que la ralentización de la velocidad de inmovilización de proteínas a través de la química IMAC se puede lograr añadiendo imidazol durante el proceso de inmovilización. De este modo, el imidazol competiría con las His a la hora de formar los enlaces de coordinación con los quelatos metálicos (Vunnum et al., 1995). Una vez que la Tt27-GDH fue inmovilizada en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx en presencia de imidazol a pH 7, la Tt27-ADH2 fue co-inmovilizada en el mismo soporte en condiciones de pH 10 manteniendo la concentración de imidazol utilizada en la primera inmovilización. En este caso, el imidazol no afectó a la inmovilización de Tt27-ADH2 a través de la química del glioxil. Aunque el efecto del imidazol no pudo ser observado a nivel macroscópico en los valores de velocidad de inmovilización de la enzima Tt27-GDH (también se inmovilizo el 100 % en menos de 15 minutos), sí que fue observado a nivel microscópico mediante CLMS, que permitió ver una distribución mucho más homogénea de Tt27-GDH a lo largo de las partículas porosas (**Figura 5. 52C**). De este modo conseguimos que tanto la enzima regeneradora Tt27-GDH como la enzima principal co-localizaran, no solo dentro del mismo espacio micrométrico en el interior de una misma esfera de agarosa, sino dentro del mismo espacio nanométrico co-localizando a través de toda la superficie porosa.

Como se puede observar en la **Figura 5. 52C**, la Tt27-GDH, en presencia de imidazol, se distribuyó de forma más homogénea a lo largo de la superficie del poro de las partículas de agarosa que cuando la misma enzima fue inmovilizada sin presencia de imidazol. Por tanto, en este caso las enzimas marcadas se distribuyeron más homogéneamente a través de la superficie del poro. El patrón de fluorescencia observado en estos experimentos fue uniforme en todas las muestras como puede observarse en un campo mayor (**Figura 5. 53**).

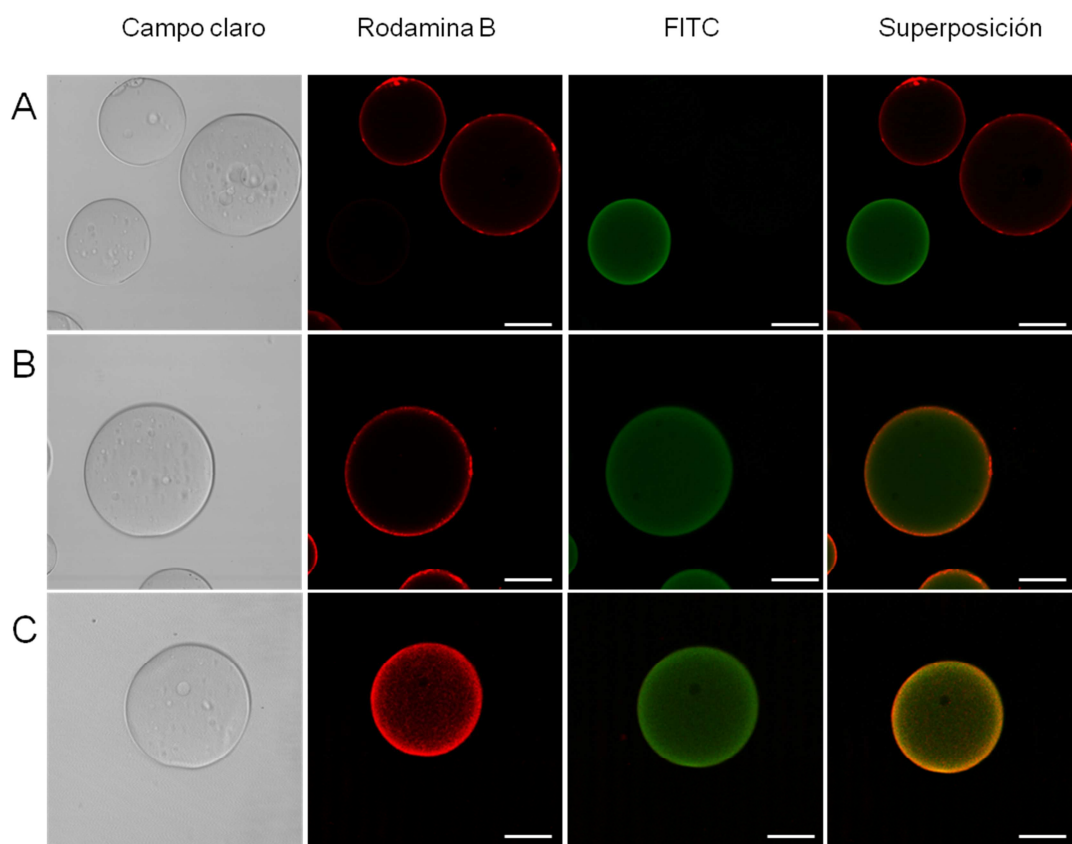


Figura 5. 52. Microscopia láser confocal de barrido (CLMS) de preparaciones inmovilizadas de Ti27-ADH2 marcada con fluorescamina (verde) y Ti27-GDH marcada con rodamina B (roja). Para cada protocolo de inmovilización, se muestran 4 imágenes de izquierda a derecha: campo claro, fluorescencia de rodamina B, fluorescencia de fluoresceína (FITC) y superposición de la fluorescencia roja y verde. **(A)** Las dos enzimas fueron inmovilizadas por separado en Ag-IDA-Ni²⁺-Glx, Ti27-GDH fue inmovilizada en batch a pH 7 vía química IMAC, mientras que la Ti27-ADH2 fue inmovilizada en el mismo soporte pero por separado a pH 10 vía química glioxil. **(B)** Las dos enzimas marcadas se co-inmovilizaron secuencialmente en el mismo soporte (Ag-IDA-Ni²⁺-Glx), primero la Ti27-GDH a pH 7 y después la Ti27-ADH2 a pH 10. **(C)** Ambas enzimas fueron co-inmovilizadas secuencialmente, como en B, pero en este caso la Ti27-GDH se inmovilizó en presencia de 0,2 M de imidazol a pH 7.

Como resultado de los experimentos anteriores, se obtuvieron dos tipos de biocatalizadores 2-1 con diferente localización espacial de las enzimas involucradas en el sistema bio-redox. Se estudió la eficiencia regeneradora de NADH de estos dos biocatalizadores co-inmovilizados. En la **Figura 5. 54**, puede observarse como cuando las dos enzimas estaban distribuidas de forma más homogénea la eficacia de la regeneración del NADH aumentó 1,5 veces con respecto a cuando, aun estando las dos enzimas localizadas en la misma partícula porosa, una enzima estaba heterogéneamente distribuida (Ti27-GDH) y la otra estaba homogéneamente distribuida (Ti27-ADH2) a lo largo de la superficie de los poros.

Las mayores diferencias en términos de eficiencia de regeneración del cofactor fueron incluso más notables cuando se utilizaron concentraciones muy bajas de NADH (véase **Figura 5. 54**). Por lo tanto, la distribución homogénea de las dos DHs dio lugar a un biocatalizador 2-1 del sistema C más eficiente para llevar a cabo la reducción asimétrica de la TFA.

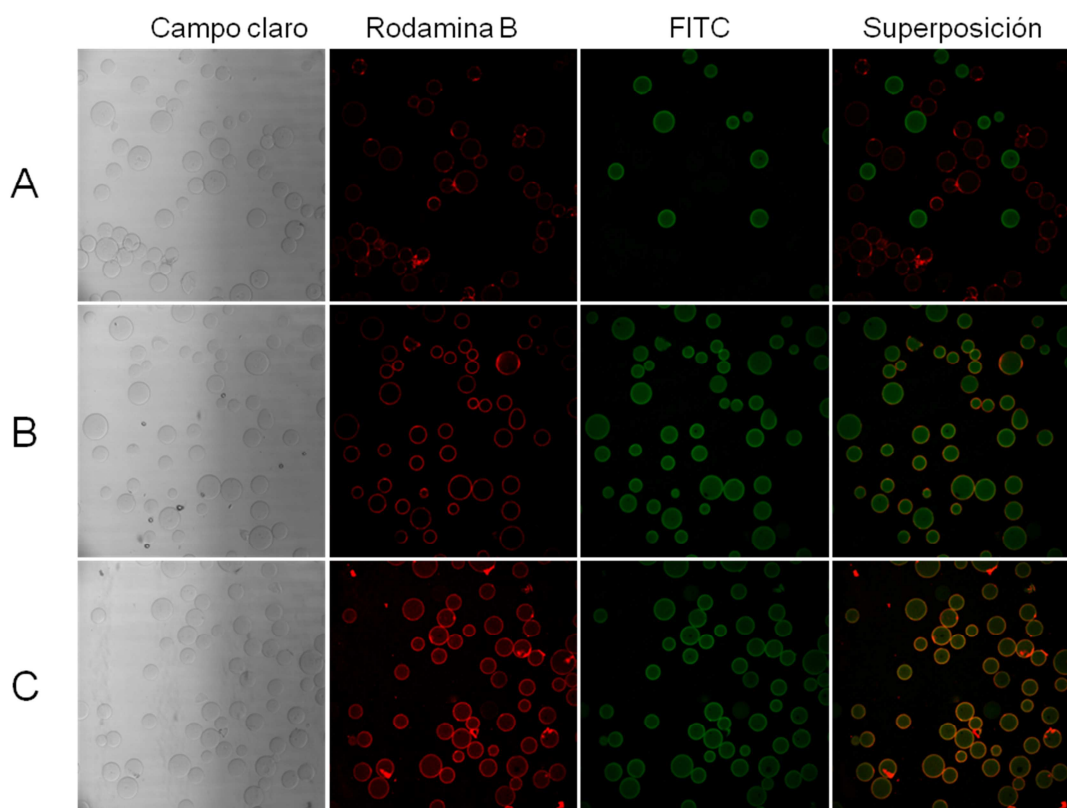


Figura 5. 53. Microscopía láser confocal de barrido (CLMS) de derivados inmovilizados de Ti27-ADH2 marcada con fluorescamina (verde) y Ti27-GDH marcada con rodamina B (rojo). Las dos enzimas fueron inmovilizadas en Ag- Ni^{2+} /G utilizando diferentes protocolos. Para cada protocolo de inmovilización, se muestran 4 imágenes de izquierda a derecha, campo claro, fluorescencia de rodamina B, fluorescencia de fluoresceína (FITC) y superposición de la fluorescencia roja y verde. (A) Las dos enzimas fueron inmovilizadas por separado en Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx, Ti27-GDH fue inmovilizada en batch a pH 7 vía química IMAC, mientras que la Ti27-ADH2 fue inmovilizada en el mismo soporte pero por separado a pH 10 vía química glioxil. Los dos derivados inmovilizados fueron mezclados y utilizados como un sólo biocatalizador heterogéneo. (B) Las dos enzimas marcadas fueron secuencialmente co-inmovilizadas en el mismo soporte (Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx), primero la Ti27-GDH a pH 7 y después la Ti27-ADH2 a pH 10. (C) Ambas enzimas fueron co-inmovilizadas secuencialmente, como en B, pero en este caso la Ti27-GDH se inmovilizó en presencia de 0,2 M de imidazol a pH 7.

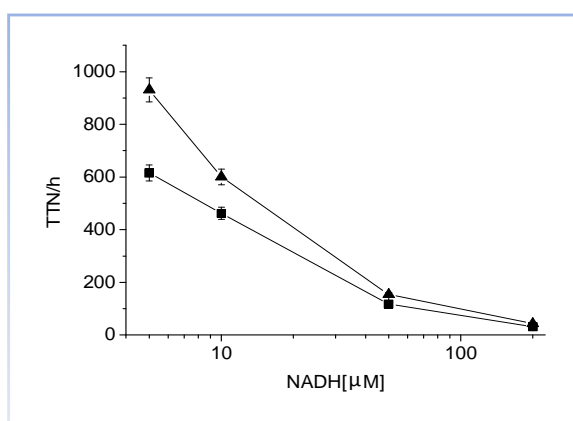


Figura 5. 54. Efecto de la distribución espacial de las enzimas en la superficie de los poros de agarosa en la eficiencia de la regeneración. Símbolos: (■) sistema C co-inmovilizado en Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx como muestra la Figura 5. 52B, Ti27-GDH distribuida de forma heterogénea en la parte superficial del poro; (▲) ambas DHs co-localizadas de forma más homogénea a lo largo de la superficie del poro como muestra la Figura 5. 52C. La reacción se llevó a cabo con diferentes concentraciones de NADH a pH 7 y 25 °C con 10 mM de TFA. El valor del TTN/h para cada concentración de cofactor fue la media de 3 experimentos.

De este modo, la velocidad inicial de la reacción fue mayor cuando las dos DHs co-localizaron de forma más homogénea (**Figura 5. 52C**) a lo largo de la superficie del poro (**Tabla 5. 17**) que cuando la distribución de la Tt27-GDH fue heterogénea (**Figura 5. 52B**). Al final de la reacción (100 % de conversión) se obtuvo un *e.e* del 96 % hacia el alcohol (*S*)-(+)- α -(trifluorometil) bencílico.

Tipo biocatalizador	[NADH] inicial (mM)	Velocidad inicial reacción ($\mu\text{mol/min}$)	Conversión 5 h 30 min (%)
Biocatalizador 2-1	0,005	0,051	3,5
Biocatalizador 2-1	0,01	0,077	5,65
Biocatalizador 2-1	0,05	0,098	10
Biocatalizador 2-1	0,2	0,105	11,5
Biocatalizador 2-1*	0,005	0,077	8
Biocatalizador 2-1*	0,01	0,1	9,25
Biocatalizador 2-1*	0,5	0,128	12,75
Biocatalizador 2-1*	0,2	0,144	19,3

Tabla 5. 17. Conversión del Sistema C a las 5, 5 horas de reacción. Condiciones de reacción: 10 mM de TFA fueron reducidos con 0,4 U de Tt27-GDH y 0,15 U de Tt27-ADH2, con las concentraciones de NADH iniciales indicadas, 50 mM de fosfato de potásico, 0,1 M de ácido glutámico a 55 °C y pH 8. Volumen total de la reacción: 5 mL. Biocatalizador 2-1*: enzimas inmovilizadas en presencia de imidazol, distribución más homogénea. Biocatalizador 2-1: DHs inmovilizadas sin presencia de imidazol

5. 5. 2. 4. Impacto del exceso de enzima regeneradora en la eficiencia de la regeneración *in situ* del cofactor.

El incremento de la cantidad de enzima regeneradora durante la reacción redox mejora la eficiencia de la regeneración del cofactor. Además, es siempre aconsejable que durante la reacción redox haya un exceso de DH regeneradora con respecto a la DH principal (Chenault et al., 1988; Leonida, 2001; Wichmann and Vasic-Racki, 2005). Sin embargo, hay pocos estudios acerca de cómo influye la relación DH regeneradora/DH principal si ambas enzimas están co-inmovilizadas en la misma superficie porosa. Para estudiar tal efecto, se utilizó el sistema C. Se estudiaron diferentes proporciones de Tt27-GDH/Tt27-ADH2. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo mediante la reducción asimétrica de TFA utilizando 0,5 μM de NADH. En la **Figura 5. 55**, puede observarse el valor del TTN/h para cada biocatalizador utilizando diferentes proporciones Tt27-GDH/Tt27-ADH2, ya sean co-inmovilizadas (biocatalizador 2-1) o inmovilizadas por separado (biocatalizador 2-2). En todos los casos, el sistema co-inmovilizado mostró mayores valores de TTN/h que el sistema con ambas enzimas inmovilizadas por separado. El mayor TTN/h (9000) obtenido tuvo lugar utilizando el derivado resultante de la co-inmovilización con una proporción Tt27-GDH/Tt27-ADH2 de 5.

Resultados

El otro resultado interesante que se puede deducir de la **Figura 5. 55**, fue que el incremento del proporción Tt27-GDH/Tt27-ADH2 en el biocatalizador 2-2 produce un incremento del TTN/h de aproximadamente 3 veces mientras que el incremento de esta proporción en el biocatalizador 2-1 incrementó el TTN/h dos veces. Por tanto, el incremento de la proporción DH regeneradora/DH principal tuvo un mayor impacto en la mejora del valor del TTN/h para el biocatalizador 2-2 que para el biocatalizador 2-1.

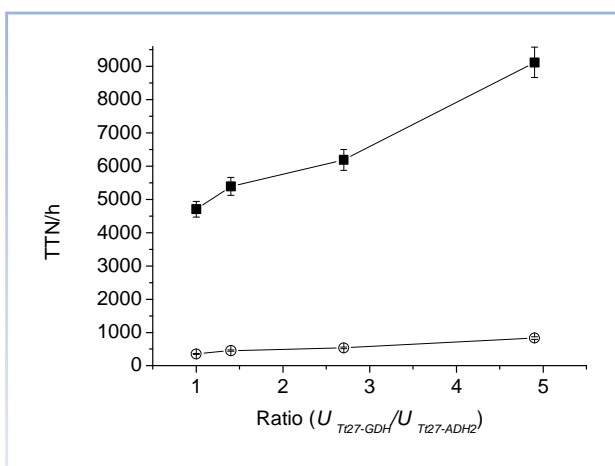


Figura 5. 55. Efecto de la proporción Tt27-GDH (DH regeneradora)/Tt27-ADH2 (DH principal) en el valor de TTN/h. Diferentes biocatalizadores bi-enzimáticos fueron preparados inmovilizando por separado (biocatalizador 2-2) (○) y co-inmovilizando (biocatalizador 2-1) (■) Tt27-GDH y Tt27-ADH2 en diferentes proporciones (de 1 a 5). Las reacciones fueron llevadas a cabo a 0,5 μM NADH a pH 7 y 25 °C con 10 mM de TFA. El valor de TTN/h para cada concentración fue la media de tres experimentos



Discusión

6. DISCUSIÓN.

6. 1. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN Y REACTIVACIÓN DE UNA ALCOHOL DESHIDROGENASA RECOMBINANTE DE *Thermus thermophilus* HB27 (Tt27-ADH2).

6. 1. 1. Expresión y purificación de la Tt27ADH2 recombinante.

Una nueva alcohol DH de cadena corta fue identificada en el genoma de *T. thermophilus* HB27. La proteína codificada por este gen es un 99 % homóloga a una alcohol deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB8 que ha sido cristalizada (código PDB: **1uay**) dentro del programa *Structural-Biological Whole Cell Project* (www.thermus.org) pero no caracterizada. La Tt27-ADH2 presenta un 35% de homología con otra alcohol DH de *T. thermophilus* HB27 (Tt27-ADH1) previamente descrita (Pennacchio et al., 2008) y con otras alcoholes DHs (SDRs) de origen mesófilo como la ADH de *Lactobacillus brevis* (Lb-RADH) (29%), *Leifsonia* sp. cepa S749 (Ls-ADH) (37%) y la 1-feniletanol DH de la bacteria desnitrificante *Azoarcus* sp. de la cepa EbN1 (DB-SADH) (24%). Como pudo observarse en **Figura 5. 1**, la Tt27-ADH2 contiene los cuatro residuos catalíticos conservados en la familia de las SDRs como también el motivo rico en Gly involucrado en la unión de la coenzima. Mientras que la proteína Lb-RADH posee una Gly en vez de Asp en la misma posición, lo que explica la especificidad por el cofactor de nicotinamida (NADP(H)).

Esta enzima, una vez clonada y expresada en *E.coli*, fue purificada aprovechando la ventaja de su naturaleza termófila se diseñó un protocolo de purificación que incluía un primer paso consistente en un tratamiento térmico (70 °C durante 1 hora) para eliminar la mayoría de proteínas mesófilas. Durante este primer paso, la enzima conservó cerca del 100 % de su actividad catalítica. Después del tratamiento térmico, el 90 % de las proteínas del microorganismo hospedador precipitaron formando agregados alcanzándose un factor de purificación próximo a 10. Incubando el sobrenadante (donde se encontraba la proteína de interés, que tan sólo tiene una His por monómero) obtenido en el paso anterior con Ag-IDA-Ni²⁺, la mayor parte de las proteínas no eliminadas (alrededor del 5 %) en el tratamiento térmico se unieron al soporte IMAC, mejorando notablemente el factor de purificación (véase **Tabla 5. 1**). La aparente movilidad electroforética de esta enzima (27 KDa) (véase **Figura 5. 2**) concordó con el tamaño esperado deducido de la secuencia del gen (26,8 kDa) y es similar al de otras SDRs (Okamoto et al., 2011; Pennacchio et al., 2010b; Rocha-Martin et al., 2009).

6. 1. 2. Especificidad de sustrato de la Tt27-ADH2.

El gen de la nueva ADH de cadena corta identificada en el genoma de *T. thermophilus* HB27 pertenece a la familia de las SDRs, y presenta una homología del 24-35% respecto a otras DH de cadena corta de origen bacteriano que han sido previamente caracterizadas (Okamoto et al., 2011; Pennacchio et al., 2008; 2010b). Esta enzima mostró 6,6 mayor actividad por el NADH que por el NADPH como cofactor. Esta evidencia experimental concuerda con la presencia de un residuo Asp en la posición 33 que determina la especificidad por el cofactor (Filling et al., 2002; Kallberg et al., 2002; Pennacchio et al., 2008). Sin embargo su especificidad por dicho coenzima no es estricta ya que está fue capaz de usar NADPH como cofactor redox, a diferencia de otras DH homólogas que fueron totalmente estrictas para el uso de cofactor nicotidámico no fosforilado (Pennacchio et al., 2008). Algo similar ocurre en la Ls-ADH, aunque esta enzima parece ser menos eficiente en el uso del NADPH que la Tt27-ADH2.

Como la mayoría de proteínas homólogas, la Tt27-ADH2 mostró mayor actividad en la reducción que en la oxidación de sustratos en las condiciones estudiadas (pH 7 y 65 °C). Esta enzima presentó una alta actividad para la reducción de cetonas como la TFA mientras que la actividad hacia la acetofenona fue muy baja. Las cetonas cíclicas no halogenadas fueron también reducidas eficientemente aunque la disminución del tamaño de uno de los sustituyentes de la cetona redujo la actividad enzimática como puede observarse comparando las actividades hacia 2-metil-ciclohexanona y ciclohexanona (véase **Tabla 5. 2**). La enzima también redujo eficientemente aldehídos quirales como el 2-fenilpropanal. Desde un punto de vista más general, esta enzima parece requerir cetonas con sustituyentes más voluminosos, lo cual explicaría la alta actividad con la TFA que contiene un sustituyente CF_3 que tiene mayor volumen espacial que el grupo CH_3 de la acetofenona (volumen de van der Waals, 42.7 y 24.5 Å³, respectivamente) (Pennacchio et al., 2008).

La Tt27-ADH2 fue altamente enantioselectiva, produciendo preferentemente alcohol (*S*)-(+)- α -(trifluorometil)bencílico, mientras que produjo ambos isómeros del 1-feniletanol. Tales resultados, sugieren que sustituyentes menos voluminosos conducen a una menor selectividad. Este efecto sólo se ha observado en la Tt27-ADH2 porque otras enzimas homólogas como la Tt27-ADH1 y Ls-ADH son muy selectivas hacia TFA y acetofenona (Inoue et al., 2005b; Pennacchio et al., 2008). Por otra parte, la selectividad de la Tt27-ADH2 hacia la TFA fue la opuesta a la encontrada en la Tt27-ADH1. Estas diferencias en la enantioselectividad podrían ser apoyadas por la divergencia en la unión de la TFA a los sitios activos de ambas enzimas (Pace et al., 2011) (véase **Figura 6. 1**).

En la **Figura 6. 1** se muestra la conformación de mínima energía con los sustratos TFA y 2-fenilpropanal localizados en el sitio activo de Tt27-ADH2. En el caso de la TFA, teniendo en cuenta la posición de la adenosina y la conformación resultante del alcohol secundario (isómero *S*), podría ser plausible que la transferencia del protón tuviera lugar a través de la cara *Si* del TFA. El análisis estructural apoya la selectividad anti-Prelog de la Tt27-ADH2. Por el contrario, en el centro activo de la Tt27-ADH1 (Pace et al., 2011; Pennacchio et al., 2010a), la donación del hidruro a la TFA sería a través de la cara *Re* lo que explicaría la selectividad Prelog de la enzima.

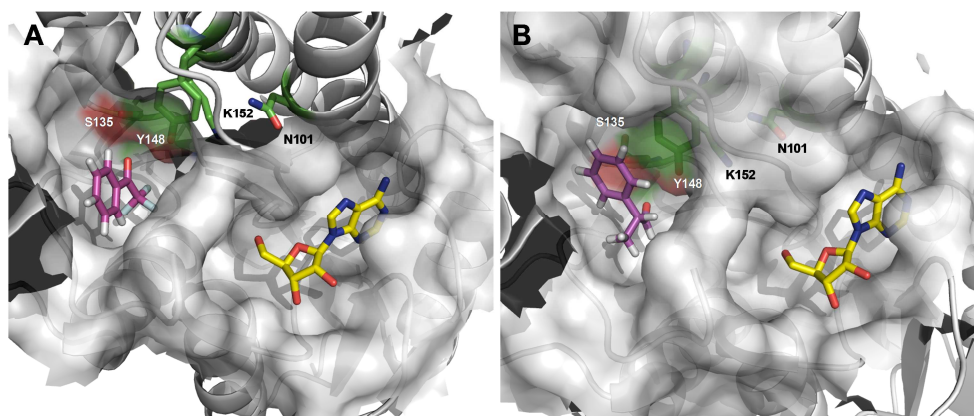


Figura 6. 1. Conformación de mínima energía de acoplamiento de la TFA (A) y (2R)-2-fenilpropanal (B) en el centro activo de la Tt27-ADH2. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, USA) utilizando el pdb obtenido de los cálculos del Swiss Dock. En amarillo se representa el cofactor unido a su sitio de unión. En verde, los cuatro residuos conservados que forman la tétrada catalítica (N101, S135, Y148 and K152).

En el caso del (2R)-2-fenilpropanal, la conformación de mínima energía estaría altamente estabilizada por una posible interacción tipo apilamiento pi (π -stacking) entre el anillo aromático del sustrato y el del residuo Y148. El sitio activo parece ser bastante grande para acomodar el enantiómero *S*, aunque de un modo menos favorable. Este hecho, podría ser apoyado por el valor de *e.e.* observado para esta enzima.

La producción del isómero *S* del alcohol α -(trifluorometil)bencílico por la Tt27-ADH2 hace a esta enzima interesante ya que hay un número limitado de ADHs que catalizan la transferencia de protones desde la coenzima por la cara *Si* del sustrato (Faber, 2006). Además, hasta el momento no se conoce otra enzima termófila dependiente de NAD que sea específicamente anti-Prelog hacia cetonas de cadena corta. Tal selectividad es comparable a la encontrada en otras oxidoreductasas mesófilas de la familia de las SDRs pero con estructura cristalina desconocida (Inoue et al., 2005b). Por otro lado, pero igual de interesante, es la selectividad de esta enzima para reducir el isómero *R* del 2-fenilpropanal produciendo el correspondiente alcohol primario quiral. Esta es la primera enzima descrita capaz de producir de forma selectiva el isómero *R* de 2-fenil-1-propanol.

Por otra parte, como se apuntó anteriormente, la actividad oxidativa de la Tt27-ADH2 fue menor que la reductiva. No mostró actividad hacia alcoholes primarios y/o alifáticos, mientras que la mayor actividad oxidativa (sólo 16% con respecto a la mejor actividad reductiva) fue hacia alcoholes secundario cíclicos (véase **Tabla 5. 2**). Además, fue sorprendente que no mostrara actividad oxidativa frente al alcohol α -(trifluorometil)bencílico aunque reducía muy eficientemente su correspondiente cetona. Por el contrario, fue capaz de oxidar el 1-feniletanol, aunque con muy baja eficiencia catalítica. Un efecto similar se encontró en la Tt27-ADH1, la explicación podría basarse en la naturaleza electroceptora de los sustituyentes flúor que podrían afectar negativamente a la desprotonación del alcohol para dar la correspondiente cetona (Pennacchio et al., 2008). En el caso del 1-feniletanol, la enzima presentó una

enantioselectividad muy baja puesto que oxidaba por igual ambos enantiómeros. Esto fue un hecho diferencial con respecto a otras SDRs las cuales fueron muy enantioselectivas en la oxidación de dicho sustrato (Inoue et al., 2005a; Niefind et al., 2003; Pennacchio et al., 2008; Weckbecker and Hummel, 2006). A la luz de la pobre selectividad hacia el 1-feniletanol, la Tt27-ADH2 podría ser explotada en química asimétrica para obtener compuestos proquirales de mezclas racémicas.

Finalmente, la enzima fue capaz de oxidar β -hidroxi ésteres alifáticos pero apenas redujo α -cetoésteres y α -cetoácidos. Este comportamiento es justo el opuesto al observado en la Tt27-ADH1 y Ls-ADH donde tiene lugar la reducción de tales sustratos mientras que la oxidación no.

6. 1. 3. Caracterización bioquímica de la Tt27-ADH2.

La caracterización cinética de la enzima demostró una vez más, la mayor eficiencia catalítica de ésta para la reducción que para la oxidación bajo condiciones de pH neutro. Esta preferencia catalítica significó que la Tt27-ADH2 fue capaz de unir 10 veces mejor el NADH que el NAD⁺, dando lugar a una k_{cat} 20 veces mayor para la primera coenzima que para la segunda (**Tabla 5. 3**). Este comportamiento es similar en la mayoría de SDRs bajo las mismas condiciones de reacción (Inoue et al., 2005b; Pennacchio et al., 2008; Pennacchio et al., 2010b).

Otro parámetro importante para evaluar el potencial biotecnológico de la enzima fue la respuesta al pH y temperatura. El origen termófilo de la enzima se puso de manifiesto al estudiar la temperatura óptima, que fue de 85 °C (véase **Figura 5. 3**). La temperatura optima es 15° C mayor que la de la Tt27-ADH1 para la misma reacción (Pennacchio et al., 2008). Además, la AE hacia la TFA a temperaturas moderadas (30 °C) fue 7,5 U/mg lo cual permitiría su uso en condiciones térmica más moderadas (importante para sustrato lábiles empleados en química fina o farmacéutica). A pesar de la disminución de la actividad a temperaturas bajas, se podría inmovilizar una alta concentración de enzima en un soporte poroso para dar lugar a un catalizador heterogéneo con una alta actividad volumétrica más adecuada para propósitos industriales. Con respecto al pH, la enzima mostró perfiles similares tanto para la oxidación como para la reducción, mostrando su máxima actividad a pH neutro (véase **Figura 5. 4**). Este hecho es muy interesante ya que otras oxidorreductasas de la familia de las SDRs tienen diferentes pHs óptimos para la reducción y la oxidación (Inoue et al., 2005b; Pennacchio et al., 2010b; Pennacchio et al., 2008). Por tanto, esta versatilidad frente al pH tiene bastante relevancia desde una perspectiva biotecnológica porque podría solventar incompatibilidades entre la estabilidad de la enzima y del cofactor, simplificando de este modo el proceso, debido a una mejor coordinación entre pH óptimo de la Tt27-ADH2 y pH de la enzima regeneradora de cofactor.

6. 1. 4. Diseño de catalizadores heterogéneo de Tt27-ADH2 mediante estrategias de inmovilización.

El potencial de la enzima inmovilizada como catalizador industrial conlleva la optimización de la estabilidad operacional del catalizador. Es conocido que la termo-estabilización de una proteína incrementa su estabilidad operacional (Mateo et al., 2007a), sin embargo, la interacción enzima-soporte puede afectar negativa o positivamente a la estabilidad térmica y a la actividad catalítica de la enzima. Por tanto, la preparación de catalizadores con adecuadas propiedades de actividad y estabilidad, requiere un cuidadoso diseño y análisis de las diferentes estrategias de inmovilización. Durante décadas, nuestro grupo de investigación ha desarrollado numerosas técnicas de inmovilización para disponer de una batería de alternativas con el objetivo de encontrar el protocolo de inmovilización que promueva la mayor estabilización de la enzima, para así poder utilizar estos catalizadores en amplias condiciones de trabajo según las necesidades.

Por ello, esta enzima, se inmovilizó mediante diferentes químicas de inmovilización. La Tt27-ADH2 se inmovilizó irreversiblemente a través de la región más rica en Lys en agarosa activada con grupos glioxil (Ag-Glx) y a través de el residuo N-terminal en agarosa activada con bromuro de cianógeno (BrCN Sepharose®). Por otro lado, esta enzima se inmovilizó de forma reversible a través de las regiones cargadas negativa o positivamente en soportes agarosa activados con PEI (Ag-PEI) y DS (Ag-DS) respectivamente. Dependiendo del protocolo de inmovilización, el rendimiento de la inmovilización varió (véase **Tabla 5. 4**). En términos generales, la inmovilización covalente condujo a mayores rendimientos de inmovilización. La actividad expresada de la enzima inmovilizada también dependió del protocolo de inmovilización. Mientras la inmovilización en Ag-Glx (que implica rigidificación de la enzima) no promovió la inactivación enzimática, la inmovilización en soporte activado con un polímero de carga positiva (Ag-PEI) condujo a una importante reducción de la actividad recuperada. Una vez más, se ha demostrado como en las diferentes metodologías de inmovilización, los mecanismos involucrados en la interacción proteína-soporte pueden afectar a la actividad enzimática, posiblemente debido a las diferentes orientaciones y grados de rigidificación de la estructura terciaria de la enzimas obtenidos con cada una de los químicas de inmovilización (Bolívar et al., 2007).

Cuando los derivados inmovilizados fueron térmicamente inactivados por incubación a 80° C y pH 7 (véase **Figura 5. 5**), la mayor estabilización se alcanzó cuando la Tt27-ADH2 fue inmovilizada en Ag-Glx bajo condiciones alcalinas (vida media de 90 horas). Mediante este protocolo de inmovilización, la enzima estaría multipuntualmente unida al soporte dando mayor rigidez a su estructura terciaria, lo que explicaría la alta estabilidad de este derivado. La inmovilización en BrCN Sepharose® fue sólo dos veces más estable que la enzima soluble, cuya vida media fue de 5,5 horas bajo las condiciones previamente mencionadas. En este caso la enzima estaría unida al soporte por pocos enlaces, y la inmovilización no promovería la rigidificación de la estructura terciaria.

Por tanto la unión covalente multipuntual, no es solamente compatible con una alta recuperación de la actividad, sino que refuerza por rigidificación de la estructura terciaria la ya de por sí alta termoestabilidad de la enzima. Además, la obtención de un catalizador altamente activo requiere de la

adecuada orientación-interacción con el soporte, y una unión covalente multipuntual podría mejorar aun más la estabilidad.

A diferencia de los soportes utilizados para promover una inmovilización covalente, los soportes de intercambio iónico promovieron la desestabilización de la Tt27-ADH2. Esta desestabilización afectó negativamente a la estabilidad y la actividad recuperada del catalizador, lo que podría deberse a que las superficies iónicas en condiciones en la cuales la estructura de la proteína sufre una gran vibración estructural (como altas temperaturas) pueden producir la inactivación de la enzima por interacciones perjudiciales entre los residuos cargados del soporte y los con residuos cargados complementarios de la superficie de la enzima.

De esta manera, la inmovilización en Ag-Glx promovió el mayor factor de estabilización (16 veces) y la mayor actividad recuperada (70 %), y por esta razón se llevó a cabo una optimización de este derivado. Hay muchas variables que podrían ser modificadas durante el proceso de inmovilización para alcanzar un derivado óptimo en términos de estabilidad. Así, el tiempo de incubación en condiciones alcalinas juega un papel importante en la estabilidad final de los derivados (Pedroche et al., 2007). De este modo, la Tt27-ADH2 fue inmovilizada en Ag-Glx e incubada a pH 10 durante diferentes periodos de tiempo una vez la inmovilización fue cuantificada. La estabilidad de los derivados resultantes fue estudiada a 80 °C y pH 5 para poder evaluar la termoestabilidad en un corto periodo de tiempo (véase **Figura 5. 6**). Curiosamente, los tiempos más largos de incubación dieron lugar a derivados algo menos estables, siendo 6 horas el tiempo óptimo de incubación. Las enzimas de origen termófilo presentan una alta estabilidad debido a la mayor rigidez de su estructura terciaria, pero en las enzimas de naturaleza multimérica, las propiedades finales de actividad-estabilidad son más complejas, por lo que el efecto negativo de largos tiempos de incubación en la estabilidad final del derivado, podría deberse a una sobre-rigidificación de la estructura terciaria que podría afectar al ensamblaje de las subunidades. A pesar de ello, este derivado fue todavía más estable que el derivado BrCN Sepharose®.

Además, la inmovilización en Ag-Glx fue la mejor química para la alcanzar la mayor estabilidad de la Tt27-ADH2 y este protocolo pudo ser optimizado por inmovilización en agarosa 4BCL como matriz durante 6 horas a pH 10. Además, este protocolo permitió inmovilizar los dos monómeros de la enzima al soporte evitando la disociación de las subunidades (véase **Figura 5. 8**). La inmovilización covalente de la Tt27-ADH en Ag-Glx 4BCL nos permitió preparar un catalizador cuya vida media a pH 5 y 80 °C fue de 75 horas lo que significó un factor de estabilización de 200 veces con respecto a la enzima soluble. Respecto a la estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, de nuevo la enzima inmovilizada en Ag-Glx fue más estable, sugiriendo que esta orientación y la rigidificación que se consiguen mediante esta técnica fue la que promovió una mayor estabilización de la enzima frente a disolventes orgánicos, pH y temperaturas drásticas.

A la luz de estos resultados, las excelentes propiedades catalíticas de la Tt27-ADH2, más la alta actividad recuperada y la alta estabilidad (incluyendo estabilización de la estructura cuaternaria)

alcanzada mediante técnicas de inmovilización en un amplio rango de condiciones, potencian la aplicabilidad de este biocatalizador heterogéneo en química asimétrica.

6. 1. 5. Reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada.

Como se comentó en la **Introducción**, si la enzima pudiera ser parcial o totalmente reactivada después de su inactivación, aumentaría la vida media de funcionamiento del biocatalizador y, de esta manera, mejoraría la rentabilidad del proceso (Mozhaev et al., 1987). De este modo, se estudió la capacidad de reactivación del derivado Ag-Glx (mejor derivado con respecto a la estabilidad térmica) tras su inactivación parcial mediante su incubación en una disolución saturada de guanidina. En trabajos anteriores, se ha comprobado que para la mayoría de enzimas estudiadas 1 hora de incubación en una disolución saturada de guanidina fue suficiente para su inactivación (Bolívar et al., 2010; Rodrigues et al., 2009b). En los experimentos llevados a cabo con la Tt27-ADH2, se necesitó más de una hora de incubación para obtener valores de actividad residual bajos, debido a que la rigidez de la enzima es tan alta que el proceso de inactivación por desplegamiento (parcial) de la estructura de la enzima fue lento. Por ello, las incubaciones se realizaron durante 16 h, a temperatura ambiente y pH 7, para conseguir valores de actividad bajos y poder visualizar mejor los experimentos de reactivación.

En algunos casos, para lograr una reactivación total es necesario desplegar totalmente la estructura de la enzima para eliminar estructuras incorrectas que han podido formarse y replegar la enzima bajo unas condiciones controladas (Rehaber and Jaenicke, 1992; Zhi et al., 1992). En otros casos, basta con incubar la enzima en condiciones suaves para recuperar valores de actividad significativos (Rodrigues et al., 2009a; Romero et al., 2009). En este caso, sólo fue necesario incubar en medio acuoso, independientemente del pH y temperatura, para recuperar valores cercanos al 80 % e incluso 90 % de la actividad inicial. La eficiencia de reactivación de la Tt27-ADH2 inmovilizada en Ag-Glx se comparó con la de la enzima inmovilizada en BrCN Sepharose®, obteniéndose en este último caso unos valores de reactivación mucho más inferiores (sólo recuperó un 20 % de su actividad inicial). Por tanto, los mejores resultados de la reactivación se obtuvieron con la Tt27-ADH2 inmovilizada a pH 10 en Ag-Glx, donde la unión covalente multipuntual podría favorecer el correcto replegamiento de la enzima (Rodrigues et al., 2009a; Soler et al., 1997). Es plausible pensar que en estos derivados donde la enzima esta unida al soporte por varios enlaces covalentes que permanecen intactos durante el proceso de desplegamiento ó inactivación, habría más puntos de referencia para comenzar el replegamiento de la proteína, haciendo que este proceso sea más efectivo (Rodrigues et al., 2009a; Soler et al., 1997). Además, la región involucrada en la inmovilización podría ser una región inestable que podría jugar un papel importante en las primeras etapas del plegamiento, por tanto la fijación espacial de esa región mediante unión covalente multipuntual a estructura sólidas podría facilitar el replegamiento correcto. Por tanto, la inmovilización en Ag-Glx, aparte de las buenas propiedades de actividad y estabilidad fue totalmente compatible e idónea desde el punto de vista de la posibilidad de reactivación del catalizador.

Otra preocupación cuando se preparan biocatalizadores para su uso industrial es el uso de disolventes orgánicos que pueden provocar distorsiones estructurales locales más que desplegamientos globales (Kuper et al., 2007). Estas distorsiones locales pueden ser debidas a la ruptura de interacciones no covalentes en la superficie de la enzima debido a que los disolventes orgánicos retirarían la capa de agua esencial para la actividad de la enzima (distorsiones fácilmente solventables retirando el disolvente orgánico) (Laane et al., 1987; Vazquez-Figueroa et al., 2008; Yang et al., 2004). Por otro lado, también podría ocurrir un desplegamiento interno a mayor escala de los dominios proteicos si el disolvente penetrara hasta los bolsillos hidrofóbicos de la enzima (estas distorsiones tendrían mayor dificultad para ser revertidas). Por ello, el derivado Ag-Glx, que resultó ser el más estable y el que presentó una mayor capacidad de reactivación, fue sometido a la inactivación en presencia de una alta concentración de disolvente orgánico (50 % de dioxano), pH ácido (pH 5) y 37 °C. Tras 4 horas de incubación en estas condiciones tanto el derivado BrCN Sepharose[®] como el Ag-Glx conservaban una actividad residual cercana al 0 %. Después de lavar los derivados e incubarlos en tampón fosfato 50 mM pH 7 a 65°C, el derivado BrCN Sepharose[®] no logró recuperar una actividad apreciable, mientras que el derivado Ag-Glx logró recuperar cerca del 50 % de la actividad inicial.

Una explicación a este hecho podría basarse en que la inmovilización covalente multipuntual limitaría eficientemente las distorsiones estructurales (Grazú et al., 2010). De esta manera, los protocolos de inmovilización que previenen la distorsión de la enzima provocarían que la reactivación fuera mucha más eficaz. El mismo comportamiento se ha encontrado en otras enzimas como lipasas (Rodrigues et al., 2009a) e incluso para otras oxidoreductasas termófilas como la glutamato deshidrogenasa de *T. thermophilus* HB27 (Bolívar et al., 2010).

6. 2. PURIFICACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN DE UNA GLICEROL DESHIDROGENASA RECOMBINANTE DE *Citrobacter braakii* (Cb-GyDH).

6. 2. 1. Diseño de catalizadores heterogéneo de Cb-GyDH mediante diferentes estrategias de inmovilización.

Como se describió en el **apartado 5. 2**, el gen que codifica para esta enzima fue amplificado por PCR, clonado y expresado en *E. coli*. La purificación se llevó a cabo, aprovechando la ventaja de la etiqueta de 6 His con la que fue clonada la enzima, mediante soportes cromatográficos de afinidad (Ag-IDA-Ni²⁺). Mediante el uso de diferentes estrategias de inmovilización covalente sobre soportes mono y heterofuncionales se promovió la inmovilización de la enzima-soporte a través de diferentes orientaciones, con el fin de aumentar la rigidez de la enzima, a través diferentes regiones, que pudieran estar involucradas en el posible cambio conformacional inducido por la unión del inhibidor alostérico a la enzima, y de este modo disminuir, en lo posible, el efecto del inhibidor.

En el **apartado 5. 2** se describió como cuando una disolución enzimática de Cb-GyDH es tratada con EDTA, la actividad enzimática se reduce considerablemente y sólo se restituye su actividad cuando adicionamos Mn^{2+} (Daniel et al., 1995). Cuando se inmovilizó la enzima en Ag-Glx utilizando tampón bicarbonato de sodio pH 10, la actividad de la suspensión y del sobrenadante cayó rápidamente y sólo pudimos recuperar alrededor del 20 % de la actividad inmovilizada en el soporte. Además, al medir la actividad de la disolución enzimática en tampón bicarbonato pH 10, ésta se veía inhibida. La explicación más probable fue que el Mn^{2+} que contenía la enzima formaba complejos con el bicarbonato, y estos complejos tenderían a precipitar a pHs por encima de 7 debido a su baja solubilidad en agua (Hem, 1963). Así, utilizando un tampón diferente como el CAPS y añadiendo 40 % de PEG600 para aumentar la estabilidad de la enzima a pH 10, se pudo recuperar una actividad expresada del 40%. Esta mayor estabilización de la enzima a pH 10 gracias al PEG pudo ser debida a un mayor grado de hidratación de la superficie de la proteína (hidratación preferencial) (Bolen, 2004).

La inmovilización de la enzima en soportes heterofuncionales dio lugar a catalizadores heterogéneos, en general, con una actividad recuperada de entre el 30-36 % y altos rendimientos de inmovilización (véase **Tabla 5. 6**).

Como se observó en la **Figura 5. 12**, la inmovilización de la enzima sobre el soporte Ag-Glx a través de la región con mayor densidad de Lys fue la que promovió una mayor estabilización, unas 90 veces más estable (a 65 °C y pH7) que la enzima soluble y 3,6 veces más estable que el derivado BrCN Sepharose®, donde la enzima se inmovilizó a través de su amino terminal. En este caso, la poca diferencia entre el factor de estabilización del derivado Ag-Glx y BrCN Sepharose® podría ser porque la Cb-GyDH es un hexámero, por tanto posee varios aminos terminales, por lo que podrían formarse varios enlaces enzima-soporte si existiese una buena congruencia geométrica entre la enzima y el soporte.

6. 2. 2. Estudio de la inhibición no competitiva.

Uno de los principales problemas del uso de esta enzima es la inhibición que sufre en presencia del producto de la reacción de oxidación del glicerol. La inmovilización es conocida también como una herramienta que podría contribuir a una alteración del grado de inhibición (Mateo et al., 2007a; Yusdy et al., 2009; Zheng and Zhang, 2011), por tanto la batería de catalizadores de Cb-GyDH obtenidos (enzima inmovilizada por diferentes orientaciones), fue analizada variando la concentración de DHA en el medio de reacción. Se analizó la concentración de DHA que inhibía el 50 % de la actividad enzimática (IC50) de estos catalizadores. Todos estos derivados inmovilizados de Cb-GyDH mejoraron la IC50 desde cerca de 1,3 veces (0,6 mM de DHA) a 1,7 veces (0,8 mM de DHA), donde la orientación de la enzima a través de su cola de poliHis fue la mejor opción posible.

Recientemente, se ha descrito una GyDH de *Cellulomonas* sp. (Zheng and Zhang, 2011) que mediante su inmovilización en nanopartículas magnéticas reduce 1,3 veces la inhibición por el producto.

Por tanto, la mejora de 1,7 veces de la IC50 mediante la inmovilización es la mayor encontrada hasta ahora en la bibliografía para una glicerol deshidrogenasa.

6. 3. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN, INMOVILIZACIÓN-ESTABILIZACIÓN Y REACTIVACIÓN DE LA Tt27-NOX RECOMBINANTE DE *T. thermophilus* HB27.

6. 3. 1. Expresión en *E. coli* de la Tt27-NOX (variante KHY) recombinante y purificación.

En el **apartado 5. 3** se describió la purificación y caracterización una variante de NADH oxidasa de *T. thermophilus* HB27. Esta enzima oxida NADH a NAD^+ con oxígeno como aceptor final de electrones, utilizando FAD o FMN como coenzima, y como producto peróxido de hidrógeno (Park et al., 1992). Esta variante presentó un 99 % de homología con respecto a la enzima aislada de *T. thermophilus* HB8 (Park et al., 1992). Sin embargo, la nueva variante presentó 5,9 veces mayor eficiencia catalítica que su homóloga de la cepa HB8. La secuencia del gen clonado reveló que en la posición 194 hay una Y en lugar de una H (véase **Figura 5. 13**). Esta diferencia fue corroborada por una segunda amplificación, clonación y secuenciación del gen desde el ADN genómico, lo que sugiere un error en la anotación en la secuencia original (Henne et al., 2004) o una mutación durante su crecimiento y mantenimiento de la cepa en el laboratorio durante estos años. Cuando las secuencias de ambas oxidasas fueron alineadas, se encontraron tres diferencias en su secuencia de aminoácidos en las posiciones 166, 174 y 194 con respecto a la variante de HB8, estas diferencias podrían estar relacionadas con la mayor eficiencia catalítica de la NOX de HB27 con respecto a la de HB8 (**Figura 5. 14**). Por las mutaciones encontradas en esas posiciones a esta variante se la denominó KHY.

Otras muestras de la cepa HB27 obtenidas de otras colecciones no contenían dicha mutación, por tanto, podemos pensar que la mayor actividad de la NOX podría deberse a una adaptación de esta cepa en nuestro laboratorio debido a su crecimiento en medio TB, donde es probable que la bacteria este sometida a un exceso de poder reductor (incremento del ratio NADH/NAD^+). Basado en estos resultados, hemos identificado una diana potencial en la secuencia primaria que podría utilizarse para optimizar la actividad catalítica por ingeniería de proteínas. Para caracterizar esta variante y sacar a luz el efecto de esta mutación en su actividad, el gen TTC0057 fue clonado en el vector de expresión pET-22b(+) para expresar la proteína en *E. coli* BL21. La mayoría de la proteína recombinante fue obtenida en la fracción soluble facilitando su purificación. La enzima ha sido descrita como dímero (Hecht et al., 1995) aunque se ha descrito una NOX de *Thermus aquaticus* YT-1 (Toomey and Mayhew, 1998) que puede formar multímeros de hasta 6 o 7 subunidades, en cuyo caso, añade una enorme complejidad al diseño de biocatalizadores heterogéneos.

Esta enzima, una vez clonada y expresada en *E. coli*, fue purificada aprovechando la ventaja de su naturaleza termófila mediante un tratamiento térmico (a 80 °C durante 45 min) para eliminar la

mayoría de proteínas mesófilas. Este tratamiento térmico a tan alta temperatura y pH 7 fue posible por la gran estabilidad de la enzima soluble, superior al de otras enzimas recombinantes de *Thermus* (Pennacchio et al., 2008; Rocha-Martín et al., 2012). Como se vio en el **apartado 5. 4. 2** y como se comentará más adelante, el protocolo de purificación tuvo que ser modificado para llevar a cabo una purificación eficiente de las variantes KRY, RHY y RRH.

6. 3. 2. Caracterización bioquímica de la Tt27-NOX recombinante.

6. 3. 2. 1. Tt27-NOX es una oxidasa dependiente de cofactor de flavina y productora de H₂O₂.

Esta enzima fue descrita por Park y col. como totalmente inactiva (apoenzima) a menos que se añada cofactor exógeno (Park et al., 1992), mientras que, como se mencionó en el **apartado 5. 3**, la variante aquí estudiada (tanto nativa como recombinante) presentó actividad sin necesidad de adicionar cofactor de flavina exógeno.

Parece ser que el mecanismo de oxidación del NADH más probable en presencia de cofactor de flavina exógeno libre es el que se muestra en la **Figura 6. 2**, donde la presencia de cofactor de flavina (FAD o FMN) estimula la actividad oxidasa de la enzima ya que la flavina libre media en la transferencia electrónica desde la flavina unida a la enzima al oxígeno (**Figura 6. 2**). (Creanga and El Murr, 2011; Tanner et al., 1996).

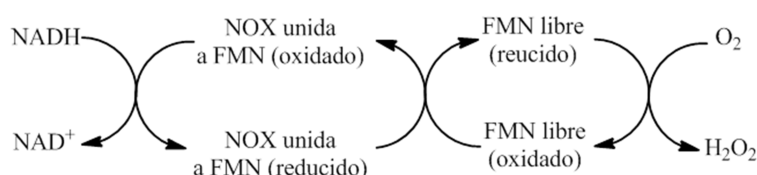


Figura 6. 2. Mecanismo de oxidación de NADH por oxígeno en presencia de Tt27-NOX y FMN exógeno libre.

Está enzima es una NADH oxidasa formadora de peróxido de hidrógeno, como hemos visto en el **apartado 5. 3. 3. 1**. Sin embargo, la producción de peróxido de hidrógeno medida fue menor a la cantidad de NADH consumido, a pesar de que el primero es equimolarmente concomitante del segundo. Esta divergencia podría explicarse por el periodo de tiempo entre la conversión del NADH y la medida de la muestra actual de H₂O₂. Aparentemente, la cantidad de H₂O₂ en el ensayo decrece lentamente, a pesar de la ausencia de NADH, el cual fue completamente convertido en el momento (Kengen et al., 2003).

6. 3. 2. 2. Perfil de temperatura y pH de Tt27-NOX (variante KHY).

La temperatura y el pH óptimos de una enzima son parámetros importantes para evaluar el potencial tecnológico de la misma. Sin embargo, a veces uno de los problemas metodológicos que presentan este tipo de ensayos es la agregación o precipitación de la enzima cuando se incuba en condiciones extremas de pH ó temperatura. Por ello, la enzima fue inmovilizada en BrCN Sepharose® en condiciones suaves para que las propiedades de la enzima fueran similares a la enzima soluble (Godoy et al., 2011b; Mateo et al., 2005), pero donde las interacciones enzima-enzima serían impedidas. Tanto la enzima soluble como inmovilizada tuvieron un comportamiento similar bajo un amplio rango de pH y temperatura, indicando que no tuvieron lugar efectos de una posible agregación. No se pudo medir temperaturas por encima de 90 °C debido a problemas técnicos y a la estabilidad del cofactor. La actividad máxima medida fue a 90 °C, confirmando que es una enzima extremadamente activa a altas temperaturas y su pH óptimo fue 5 como la enzima de la cepa HB8 (Park et al., 1992). Valores más bajos de 5 no se midieron por la inestabilidad del NADH en esas condiciones.

6. 3. 2. 3. Análisis del efecto de las mutaciones en las propiedades catalíticas de las diferentes variantes de Tt27-NOX.

Una vez la variante KHY de Tt27-NOX fue purificada, se calcularon los parámetros cinéticos para tres cofactores diferentes: NADH, FMN y FAD. Esta variante de Tt27-NOX en presencia de cofactor de flavina exógeno (150 µM) mostró casi 6 veces mayor eficiencia catalítica hacia el NADH comparada con su homóloga de la cepa HB8 bajo las mismas condiciones. Esta diferencia significativa fue debida a la menor K_m y mayor valor de k_{cat} a favor de la variante KHY. Estas diferencias podrían ser explicadas por tres amino ácidos encontrados en la secuencia de nuestra cepa HB27 (K166, H174 y Y194) que difieren de los encontrados en la cepa HB8 (R166, R174 y H194).

Debido a las diferencias encontradas entre la Tt27-NOX descrita por Park y col. (Park et al., 1992) y la variante KHY descrita en la presente Tesis Doctoral, se llevaron a cabo diferentes mutaciones en las posiciones 166, 174 y 194 del gen TTC0057 de *T. thermophilus* HB27 para analizar el efecto de cada una de ellas en las propiedades bioquímicas de la Tt27-NOX (**Figura 5. 36**).

De este modo, se construyeron los mutantes KHH, KRY, RHY, RHH (secuencia como aparece en BacMap) y RRH (variante descrita por Park y como aparece en el PDB). Se llevaron a cabo estudios estructurales mediante dinámica molecular (DM) y *docking* para encontrar una explicación plausible a las diferencias encontradas en cuanto a parámetros cinéticos, purificación y estabilidad.

Como se describió en el **apartado 5. 4. 3. 1**, la variante KRY mostró 8,5 veces más afinidad por el FMN que por el FAD, mientras que en el resto de variantes la afinidad por uno y por otro fue similar en cada variante. Como se puede observar en la **Figura 6. 3A**, el residuo α R166 (verde) establece un puente salino con α E163 (verde). Cuando α R166 es reemplazada por K (rosa), además del puente salino con α E163 se establece otra interacción con la cadena principal de α S173 (rosa). Por otra parte, el residuo

α R174 interacciona con α D88. El conjunto de estas interacciones podría desplazar algunos de los residuos más importantes para la unión del cofactor de flavina al centro activo de la enzima, como los situados en la β -lámina (α V155 y α P156) y el giro γ (α L158 y α G159) (véase **Figura 6. 3B**) (Hritz et al., 2006), de tal manera, que podría favorecerse la entrada del FMN en el sitio de unión.

Por tanto, en la variante KRY y RRH, la presencia de R en la posición 174 podría favorecer la unión del FMN (disminuye la K_m FMN), y la presencia conjunta de K166 y R174 podría entorpecer la unión del FAD (variante KRY con una $K_m = 127 \pm 20$) favoreciéndose la unión del FMN (variante KRY con una $K_m = 15 \pm 5$).

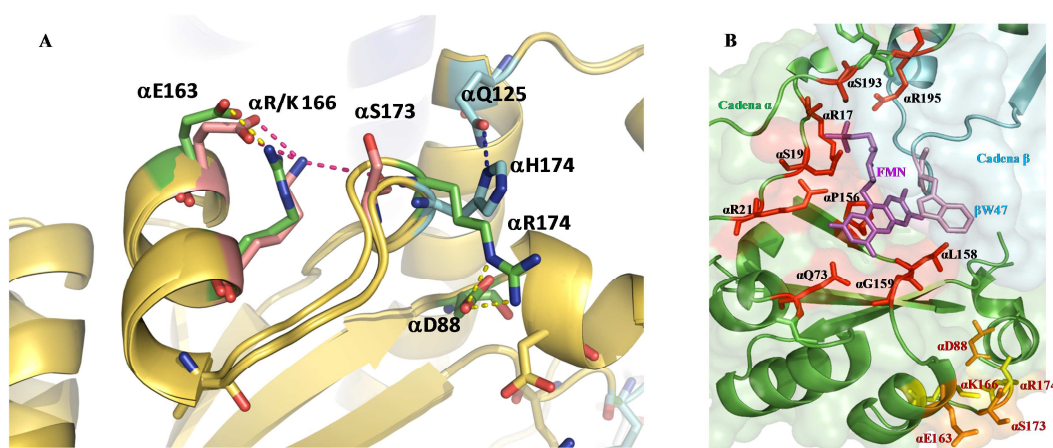


Figura 6. 3. (A) Posible efecto estructural de la sustitución R166K en la Tt27-NOX. Residuos que intervienen en la unión del FMN al centro activo (rojo), K166 (amarillo) forma un puente salino con E163 (naranja) y S173 (naranja). (B) Posición de los residuos que intervienen en la unión del FMN al centro activo de la Tt27-NOX con respecto a los residuos K166 y R174. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, EEUU).

Como se describió en el **apartado 5. 4. 2**, el protocolo de purificación tuvo que modificarse en algunos casos. En el caso de la variante KRY el protocolo sufrió dos modificaciones debido a la menor estabilidad de la enzima soluble y al adsorberse significativamente sobre el soporte Ag-DS (donde el resto de variantes no se adsorbían de modo significativo). Las interacciones anteriormente explicadas podrían dar lugar a un cambio conformacional que exponga más los residuos con carga positiva que pueden interaccionar con las cargas negativas con las que está cargado la superficie del soporte Ag-DS. A este hecho, hay que añadir que, como se puede observar en la electroforesis de los mutantes purificados (**Figura 5. 38**), la migración en el gel del monómero del mutante KRY difiere de los otros monómeros de los diferentes mutantes estudiados. Se ha comprobado que en ciertas proteínas la movilidad electroforética no sólo depende del peso molecular, sino también de la carga neta, unión diferencial del SDS a la proteína, compactibilidad de las moléculas de proteínas, forma hidrodinámica adoptada por la proteína, etc., (Tung and Knight, 1972). Por tanto, ese posible cambio conformacional provocaría, que además de adsorberse a Ag-DS, migrará en la electroforesis de manera diferencial (quizás por su mayor

Discusión

interacción con el SDS) con respecto al resto de variantes. Todos estos hechos podrían explicar, también, que esta variante fuera la más inestable de todas las estudiadas.

Las variantes KHH y KHY fueron las enzimas más estables y activas analizadas. La sustitución α R166H produce, aparte del puente salino con α E163, que se forme también una interacción con α S173. Cuando se produce el cambio α R174H, se modifica la interacción de α R174 (verde) con α D88 (verde) por α H174 (azul) con α Q125 (azul) (**Figura 6. 4**). Estos cambios, podrían desplazar el lazo sobre el que se sitúan α S173 y α R/ α H174. El residuo α Q125 se encuentra al inicio de la α -hélice nº 9 (compuesta por los residuos 125-149) y por tanto muy próxima a la α -hélice nº 8 (compuesta por los residuos 107-121) que forma interacciones hidrofóbicas débiles con la cadena lateral de β W47 durante el estado de “conformación abierta”. Este residuo W47 se ha descrito que podría actuar como una puerta que permite o bloquea el acceso del sustrato al cofactor de flavina (véase **Figura 6. 3B**) (Hritz et al., 2006).

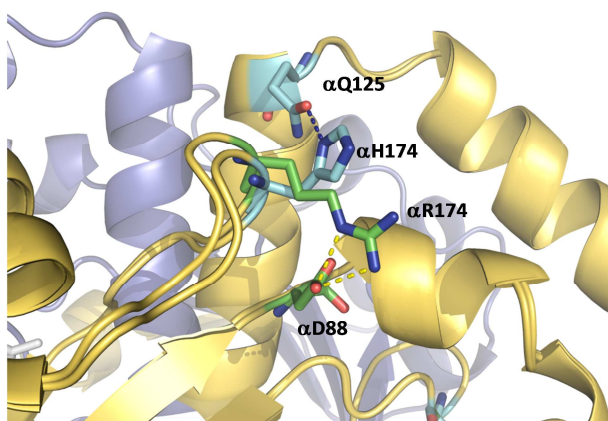


Figura 6. 4. Posible efecto estructural de la sustitución **R174H** en la **Ti27-NOX**. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, EEUU).

La sustitución H194Y se produce en la interfase del dímero (**Figura 6. 6**). En principio, ninguno de los residuos reemplazados establecería uniones polares, si bien, β H194 podría encajar mejor que la Y (**Figura 6. 5**) en el hueco que crean α H101 y α P102 (del otro monómero), aunque las distancias son demasiado grandes para postular interacciones tipo T entre β H194 con α H101. En cuanto al residuo de α P102 y el lazo completo, éstos parecen desplazarse para ocupar el lugar que dejaría libre α H101. Tampoco parece claro que se interrumpa una interacción hidrofóbica, pero si es cierto, que cambiaría la naturaleza de la interacción de α P102. Cualquier desplazamiento en el entorno de α H101 podría afectar a la unión del sustrato según algunas soluciones de *docking* hechas para el NADH sobre RRH. Además, hay que tener en cuenta que los residuos contiguos a la posición 194 (posiciones 193 y 195) se han descrito como residuos que participan en la unión del cofactor al sitio activo de la enzima (**Figura 6. 3B**) (Hecht et al., 1995; Hritz et al., 2006).

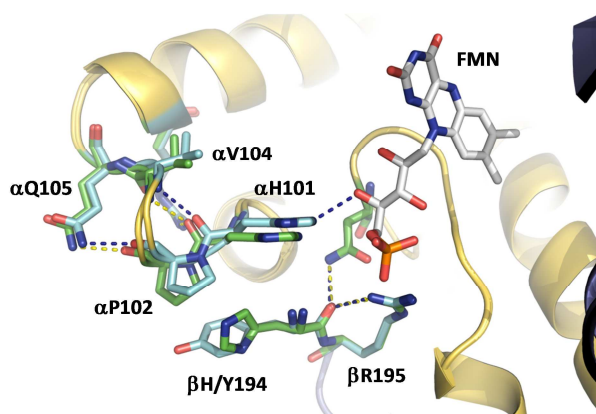


Figura 6. 5. Posible efecto estructural de la sustitución H194Y en la Tt27-NOX. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, EEUU).

En la **Figura 6. 7**, se puede observar que el hipotético desplazamiento del lazo de α H101/ α P102, facilitado por la ausencia de la interacción entre α R174 y α D88 (residuos en verde, interacción en amarillo) y puede que por la presencia de la interacción α H174 con α Q125 (residuos en azul, interacción en azul oscuro), daría movilidad a la parte de la cadena α (amarillo) que interacciona con el extremo C-terminal de la cadena β (azul) mediante contactos polares (gris oscuro). La mutación α R166K podría evitar en gran medida el desplazamiento del lazo, ya que interaccionaría con α S173, y por tanto, no habría tanto espacio para el movimiento de la cadena α . Así, sería probable que aunque faltaran interacciones, las cadenas α y β podrían sufrir un desplazamiento menor.

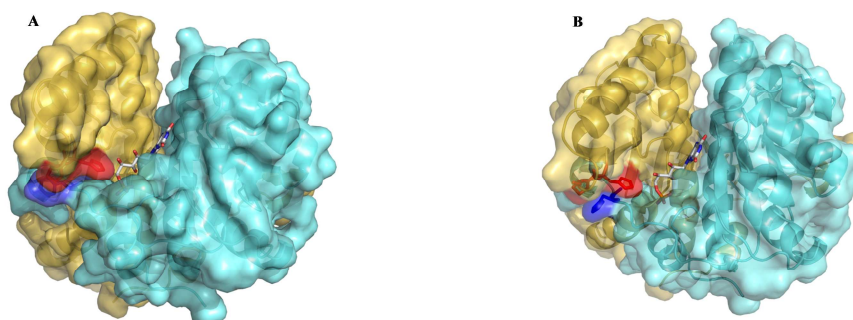


Figura 6. 6. Variantes RHY (A) y RHH (B) de la Tt27-NOX. Cadena α en amarillo y cadena β en azul. α H101 y α P102 en rojo, β H/Y194 en azul. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, EEUU).

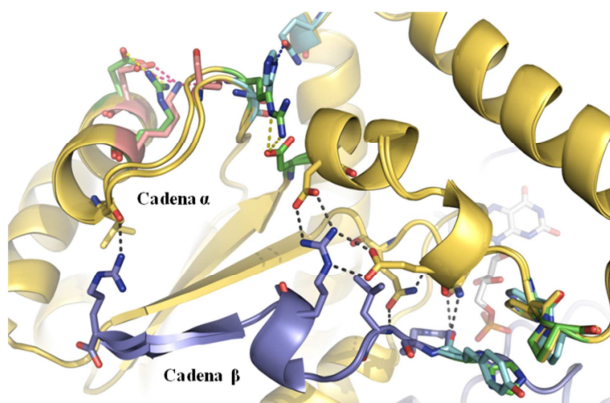


Figura 6. 7. Visión en conjunto de las posibles interacciones entre residuos. Cadena α en amarillo y cadena β en azul. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, USA).

Mediante estudios de dinámica molecular lo que se ha podido observar (**Figura 6. 8**) ha sido que durante los primeros nanosegundos de simulación la variante KHY presentó una mayor movilidad con respecto a KRY y curiosamente fue la variante más activa. Pasado este tiempo, se comportaron de manera similar.

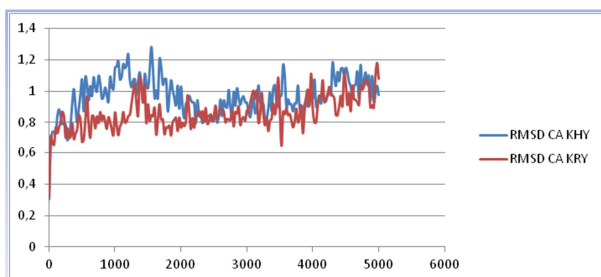


Figura 6. 8. Simulaciones de la movilidad de las variantes KHY y KRY de Tt27-NOX mediante dinámica molecular (DM)

Cuando se comparó el RMSD (del inglés Root Mean Square Deviation) por residuo de las variantes KRY y KHY promediado para toda la dinámica a partir de 500 ps, se observó que los residuos más móviles se encontraban en el entorno de la R174 introducida (en el caso de KRY) y las regiones 60-68 en un monómero y 68-75 en el otro monómero.

En el análisis de RMSF (del inglés Root Mean Square Fluctuation) no se observó ninguna tendencia diferencial que fuera reseñable. La superficie accesible a solvente calculada para la estructura promedio fue de 15949,71 Å² para la variante KHY y 15808,90 Å² para la variante KRY. Dadas las K_m para el FAD se realizaron también estudios de docking sobre KHY y KRY, pero se obtuvieron demasiadas soluciones que no convergen y muchas de ellas son válidas con los dos anillos de isoaloxazina colocados en buena posición para la transferencia de electrones.

Por tanto, la presencia de R en la posición 174 podría favorecer la unión del FMN (junto a la presencia de K166) y daría lugar a una enzima con mayor flexibilidad estructural que podría ser responsable de la menor estabilidad del mutante KRY. La cercanía del extremo N-terminal de una de las cadenas al residuo 166 y 174 de la otra cadena (**Figura 6. 9**) explicaría la gran estabilización que se observó (**Figura 5. 37**) cuando la enzima se inmovilizó en BrCN Sepharose®. Además, parece claro que

la presencia conjunta de K166 y H174 daría lugar a las variantes más activas y estables, como la estudiada en el **apartado 5. 3 de Resultados** de esta Tesis, además de aumentar el valor de la K_m tanto para el FAD como FMN con respecto a RRH (variante descrita por Park y col. y como aparece en el PDB).

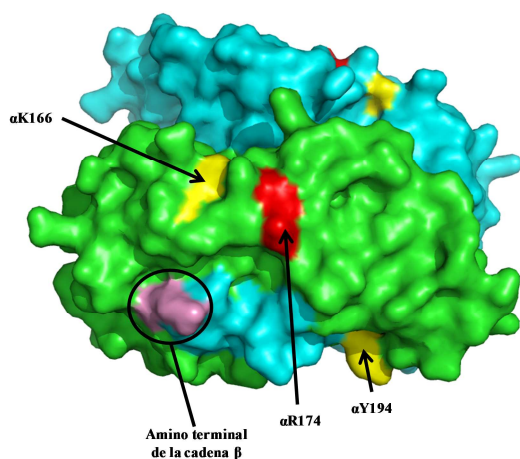


Figura 6. 9. Vista del extremo N-terminal de la variante KRY y de los residuos 166, 174 y 194. Cadena α en verde y cadena β en azul. Figura creada con Pymol 0.99 (DeLano, USA).

6. 3. 2. 4. La temperatura induce la hiperactivación de la Tt27-NOX en condiciones limitantes de cofactor de flavina.

Se ha descubierto una interesante hiperactivación térmica de la enzima en condiciones limitantes de cofactor de flavina. Esta hiperactivación ha sido mayor en las variantes KHY y KHH, que como se ha descrito en el apartado anterior fueron las variantes más estables y activas. Este descubrimiento sugiere que existe una conformación más activa de la Tt27-NOX a altas temperaturas, la cual puede promover una transferencia electrónica más eficiente entre el cofactor de flavina reducido y el oxígeno molecular para facilitar la regeneración de dicho cofactor en su forma oxidada, y que este pueda empezar un nuevo ciclo de oxidación del sustrato NADH. Como el comportamiento de la enzima libre y la enzima inmovilizada fue similar, se descartó cualquier efecto intermolecular inducido por las altas temperaturas (por ejemplo, la agregación de la enzima) y cualquier efecto de la inmovilización en sí. Esta conformación catalíticamente más eficaz sería estable aun disminuyendo la temperatura de la reacción *a posteriori*, lo que permitió mantener una AE relativamente alta a 37 °C a pesar de su origen termófilo. Cuando la actividad se midió en presencia de concentraciones saturantes de cofactor, la incubación a alta temperatura no tuvo un efecto positivo en la actividad enzimática. Esto sugiere que el efecto de esa conformación más eficaz se ve apantallado por el gran aumento de la eficiencia de transferencia electrónica propiciada por el cofactor exógeno.

Por tanto, la conformación térmicamente hiperactivada en presencia de $FADH_2/FMNH_2$ no tuvo efectos sobre la eficiencia catalítica del enzima a diferencia de lo que ocurría en condiciones limitantes de cofactor de flavina. Esta conformación hiperactivada fue más estable cuando la enzima fue expresada en

su organismo original (*T. thermophilus*). Este hecho sugiere que el efecto de hiperactivación con la temperatura es dependiente del plegamiento original de la proteína. Efectos similares se han descrito en otras proteínas termófilas que después de ser incubadas a altas temperaturas (Facchiano et al., 1992; Lamed and Zeikus, 1981; Wedler and Hoffmann, 1974), debido a reordenamientos conformacionales en regiones particulares de la proteína, pierden su plegamiento durante su expresión a bajas temperaturas. Esta característica particular hace a este biocatalizador mucho más interesante para la regeneración del NAD^+ . Puede ser acoplado a deshidrogenasas para la oxidación de alcoholes de interés a temperatura suaves sin la necesidad de añadir cofactor de flavina exógeno, haciendo el proceso mucho más económico (teniendo en cuenta que el FAD tiene un precio de 287 €/g aproximadamente, <http://www.sigmaaldrich.com>).

Todos estos resultados concuerdan con los recientemente publicados por Merkley y col. (Merkley et al., 2012), que han detectado que la enzima de la cepa HB8 permanece en su estado nativo hasta unos 75 °C, el cual es próximo a su temperatura óptima de crecimiento, y por encima de los 75 °C existe un cambio en la fluorescencia del FAD unido a la enzima y este cambio es reversible. El dicroísmo circular (DC) muestra que este cambio no se debe a un desplegamiento global de la proteína y la “dispersión de luz dinámica” (DLS) no se debe a la agregación de la proteína.

Por tanto, este efecto reversible excluye la modificación covalente (Merkley et al., 2012). Hritz y col. describieron que el residuo W47 es importante para determinar si la conformación está “cerrada” o “abierta”, como una puerta que permite o bloquea el acceso del sustrato a la flavina (Hritz et al., 2006). Merkley y col. han medido un cambio en las distancias entre algunos residuos (W47-P156 y A46-L158) próximos al centro activo (que se encuentra en la interface del dímero), y estos residuos son muy importantes porque al aumentar las distancias entre ellos darían más espacio para la inserción del sustrato (Merkley et al., 2012). Además, mediante simulaciones de dinámica molecular (DM) se ha podido comprobar como la expansión observada podría facilitar la entrada y salida del sustrato. De este modo, han propuesto que W47 podrían estar en conformación abierta permitiendo una mayor accesibilidad al centro activo a altas temperaturas. Por tanto, estos hallazgos sugieren que el incremento de la fluorescencia dependiente de la temperatura refleja un cambio conformacional en el sitio activo. Este cambio aparece gradualmente y continuamente. Por otra parte, parece claro que las estructuras cristalinas de las proteínas termófilas pueden no corresponderse con los estados activos de estas proteínas porque muchas veces estos cristales se consiguen muy alejados de las temperaturas donde son más activas.

6. 3. 3. Diseño de catalizadores heterogéneo de Tt27-NOX (variante KHY) mediante estrategias de inmovilización.

La inmovilización de proteínas es una interesante alternativa para vencer dos obstáculos importantes con los que las enzimas se enfrentan a la hora de ser utilizadas a escala industrial: re-uso y estabilidad. Además, debido al potencial biotecnológico de esta enzima, se estudió la inmovilización de

Tt27-NOX. En el campo de los biosensores ha sido inmovilizada a través de varias químicas (Creanga and El Murr, 2011; Radoi et al., 2007; Serban and El Murr, 2006). Con este fin, la Tt27-NOX se inmovilizó en agarosa a través de diferentes químicas, incluyendo técnicas de inmovilización reversibles sobre soportes de intercambio iónico (DEAE Sepharose®, Ag-MANAE, Sulfopropil Sepharose®) y soportes cromatográficos de afinidad (Ag-IDA-Cu²⁺), como técnicas de inmovilización irreversibles (Ag-Glx, BrCN Sepharose®, Ag-IDA-Glx, y soportes entrecruzados con dex-CHO). La enzima presentó una alta estabilidad, que se explica por su procedencia termófila (Cowan, 1997; Daniel and Cowan, 2000), pero en condiciones no naturales, que podrían ser operacionales, la enzima se inactivó rápidamente incluso a temperaturas relativamente bajas (pH ácido). Además, se ha comprobado que la inactivación a pH ácido depende de la concentración de enzima, posiblemente debida a la disociación de las subunidades. Así, desde un punto de vista operacional, es muy interesante estabilizar la estructura cuaternaria y la estructura terciaria de la enzima, para tener un rango de condiciones en las que la enzima sea muy estable.

De las técnicas de inmovilización estudiadas en esta Tesis, los peores resultados se obtuvieron con soportes de intercambio iónico (aniónicos y catiónicos), tanto en rendimiento de inmovilización como en actividad expresada. Posiblemente debido a que algunas veces las superficies iónicas pueden reaccionar *a posteriori* de la inmovilización con la proteína inmovilizada sobre todo en condiciones de alta vibración estructural (como altas temperaturas). Este hecho podría conducir a la inactivación de la enzima por interacciones perjudiciales enzima-soporte (Rocha-Martín et al., 2012).

En cambio, los mejores resultados se obtuvieron mediante la inmovilización irreversible. En la **Figura 5. 26** pudimos observar la estabilidad a pH 7 y 83°C de la enzima soluble y los derivados BrCN Sepharose®, Ag-Glx pH 7 tratado y sin tratar con DTT, Ag-Glx pH 10 y Ag-IDA-Cu²⁺. Los derivados más estables fueron los Ag-Glx donde la enzima fue inmovilizada a pH 10 y pH 7 (en presencia o ausencia de DTT). La incubación a pH 10 implicó la inmovilización por la región con mayor número de residuos Lys (Mateo et al., 2006) y la inmovilización a pH 7 permitió la inmovilización de la enzima en Ag-Glixil a pH neutro a través de los grupos amino terminales (siempre y cuando pudieran interaccionar simultáneamente con el mismo plano del soporte) (Bolívar et al., 2009a). El DTT estabilizó las bases de Schiff y permitió la inmovilización irreversible de enzimas a Ag-Glx a pH neutro (Bolívar et al., 2009b) y después mediante la incubación a pH 10 se involucraron las Lys próximas a esa región y así se consiguió una unión covalente multipuntual intensa. Por tanto, la orientación de la enzima sobre el soporte a través de la zona con mayor densidad de Lys y aminos primarios dio lugar a los catalizadores más estables en las condiciones estudiadas.

Como los rendimientos de inmovilización y actividad expresada de la Tt27-NOX inmovilizada primero a pH 7 en Ag-Glx no mejoraron los rendimientos de inmovilización y actividad expresada (véase **Tabla 5. 11**), así como la estabilidad a pH 7 y 83 °C, de los derivados inmovilizados a pH 10, se estudió la estabilización de la estructura cuaternaria de este derivado. Además, se estudió la estabilidad a pH

ácido y básico, también comparándolo con la estabilidad de derivados tratados con dex-CHO. Como se pudo observar en la **Figura 5. 23**, la inmovilización de la enzima en Ag-Glx no logró implicar a todas las subunidades de la proteína multimérica. Para solucionar este problema, los derivados fueron entrecruzados con dex-CHO. También se optimizó el entrecruzamiento teniendo en cuenta el tamaño del dex-CHO, el tiempo de incubación del derivado inmovilizado con el dex-CHO, la temperatura a la que se lleva a cabo esta incubación y la concentración de dex-CHO (miligramos) por miligramo de proteína. El entrecruzamiento con dex-CHO fue más efectivo a partir de un tamaño de 6 kDa, y como se pudo observar en la **Figura 5. 25**, los derivados Ag-Glx entrecruzados con 35 y 40 mg de dex-CHO por mg de Tt27-NOX, no liberaron subunidades al medio. Por lo tanto, además de estabilizar la estructura terciaria de la proteína mediante la rigidificación estructural lograda por la unión covalente multipuntual, se consiguió estabilizar la estructura cuaternaria de la enzima mediante entrecruzamiento con polímeros multi-funcionales posteriormente a la inmovilización.

En condiciones de alta temperatura y pH alejados de la neutralidad, el derivado más estable fue el Ag-Glx pH 10. Como se pudo observar en la **Figura 5. 28**, se logró mejorar de forma muy significativa la estabilidad de la enzima a pH ácido, llegando a obtener derivados con una vida media de más de 24 horas en condiciones muy drásticas, donde la vida media del derivado BrCN Sepharose® fue de unas 8 horas y de la enzima soluble de unos minutos. Por tanto, la inmovilización covalente multipuntual en soportes de agarosa activados con grupos glioxil ha resultado ser el biocatalizador más estable tanto frente a la temperatura como frente a los disolventes orgánicos. El derivado Ag-Glx-(Tt27-NOX) permitiría formar un alto número de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte, mientras que al mismo tiempo la proteína se orientaría por la región más rica en Lys (Mateo et al., 2006), dando lugar a una unión covalente intensa (Mateo et al., 2005). Esta química de inmovilización ha sido aplicada con éxito en un largo número de enzimas, alcanzando altos factores de estabilización (Mateo et al., 2006).

6. 3. 4. Reactivación en fase sólida del biocatalizador Tt27-NOX (variante KHY).

La falta de una estabilidad adecuada de los biocatalizadores es uno de los factores limitantes más importantes para la implantación de enzimas como catalizadores industriales. Debido a ello, tras estabilizar la enzima adicionalmente mediante técnicas de inmovilización, se estudió mejorar aun más la productividad de estos biocatalizadores mediante el estudio de estrategias de reactivación de derivados total o parcialmente inactivados.

Al igual que la Tt27-ADH2, la Tt27-NOX necesitó más de una hora de incubación a alta concentración de guanidina para obtener valores de actividad residual bajos, debido posiblemente a que la enzima fue desplegada lentamente posiblemente por su compactación estructural resultado de su naturaleza termófila. Por ello, las incubaciones fueron realizadas durante 16 horas, a temperatura ambiente y pH 7, para conseguir valores de actividad bajos y poder monitorizar correctamente los experimentos de reactivación.

Para los estudios de reactivación, los derivados inactivados (total o parcialmente desplegados), se incubaron en tampón fosfato a pH 7 y temperatura ambiente. Como se pudo observar en la **Figura 5. 30**, la eficiencia de reactivación dependió de la orientación de la proteína con respecto al soporte, ya que mientras el derivado Ag-Glx donde la enzima se inmovilizó a pH 10 se reactivaba hasta un 30 %, el derivado Ag-Glx donde la enzima se inmovilizó a pH 7 sólo fue capaz de reactivarse un 10 %. De este modo, este último derivado fue desechado para llevar a cabo la optimización de la reactivación. En los experimentos de optimización de la reactivación de los derivados Ag-Glx pH 10 se combinaron dos variables: temperatura (25 °C, 45 y 65 °C) y pH de incubación (5, 7 y 9) de los derivados a reactivar. Los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones de reactivación 65 °C y pH 7. Esta temperatura óptima de reactivación es cercana a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo del que procede (Cava et al., 2009). Como se pudo observar en la **Figura 5. 31**, se logró recuperar cerca de un 90% de la actividad inicial con el derivado Ag-Glx pH 10 en poco más de una hora de incubación. La necesidad de altas temperaturas para una óptima reactivación está en sintonía con la naturaleza termófila de la enzima diseñada para plegarse en las condiciones de temperatura elevada necesarias para crecimiento de la bacteria termófila.

También se comprobó la capacidad de reactivación de los derivados entrecruzados con dex-CHO, tomando como ejemplo dos derivados Ag-Glx donde la enzima se inmovilizó a pH 10, uno tratado con 25 mg de dex-CHO por mg de Tt-27-NOX y el otro con 30 mg de dex-CHO por mg de Tt27-NOX. En las condiciones óptimas de reactivación, estos derivados lograron recuperar entre un 50 % y 60 % de la actividad inicial (**Figura 5. 32**), menor porcentaje del logrado con los derivados homólogos sin tratar. Un caso similar ocurrió con los derivados BrCN Sepharose® con y sin entrecruzar con dex-CHO. Los derivados entrecruzados recuperaron menos actividad que el derivado sin entrecruzar, posiblemente a causa de limitaciones estéricas debidas a los polímeros exógenos a la enzima durante el proceso de replegamiento.

Por tanto, los mejores resultados de reactivación se obtuvieron con los derivados Ag-Glx pH 10 sin modificar con dex-CHO, que una vez reducidos, presentaban una superficie inerte lo que evita interacciones que podrían desestabilizar la proteína (Mateo et al., 2005; Mateo et al., 2006). La unión covalente multipuntual podría promover el correcto replegamiento de la enzima (Rodrigues et al., 2009a; Soler et al., 1997) y debido a los numerosos enlaces enzima-soporte, habría más puntos de referencia para llevar a cabo un replegamiento más eficiente (Bolívar et al., 2010; Rodrigues et al., 2009a; Soler et al., 1997). Además, la región involucrada en la inmovilización podría ser más importante para la reactivación y de este modo la reactivación fue total y rápida.

Al igual que en el caso de la enzima Tt-ADH2, los derivados de Tt27-NOX inactivados frente a disolvente orgánicos pudieron ser reactivados revertiendo las posibles distorsiones estructurales causadas por dichos solventes. Una explicación a este hecho se basaría en que los disolventes orgánicos producirían distorsiones locales más que un desplegamiento global de la enzima (Kuper et al., 2007). Aunque, podría ocurrir que los disolventes orgánicos condujesen a un desplegamiento de los dominios

hidrofóbicos internos de la estructura de la proteína. Como la inmovilización covalente multipuntual limita desplegamientos severos de la estructura (Grazú et al., 2010), la enzima posiblemente se inactivó por distorsiones locales en su estructura terciaria causadas por los disolventes orgánicos, por lo que ésta pudo ser fácilmente reactivada por la simple eliminación del disolvente.

6. 4. SISTEMAS MULTI-ENZIMÁTICOS INMOVILIZADOS APLICADOS A OXIDACIONES SELECTIVAS Y REDUCCIONES ASIMÉTRICAS.

6. 4. 1. Procesos redox con regeneración de cofactor en un sólo reactor catalizados por dos biocatalizadores heterogéneos.

En este apartado, los sistemas bi-enzimáticos estaban formados por dos DHs inmovilizadas por separado (es decir, cada enzima inmovilizada en una superficie porosa diferente) integradas en un mismo reactor tipo *batch*: una DH principal que catalizaba la reacción principal y una DH secundaria que regeneraba el cofactor redox.

6. 4. 1. 1. Resolución cinética del (*rac*)-1-feniletanol mediante el sistema bi-enzimático Tt27-ADH1/Tt27-NOX.

El biocatalizador heterogéneo Ag-Glx-(Tt27-NOX) altamente estable fue aplicado al reciclaje del cofactor acoplado a una ADH de origen termófilo (TT27-ADH1) para resolver cinéticamente un compuesto de relevancia en química farmacéutica como el 1-feniletanol. Como se esperaba, la selectividad de la Tt27-ADH1 fue muy alta (Pennacchio et al., 2008; Rocha-Martin et al., 2009) y el reciclaje del cofactor por la Tt27-NOX alcanzó el máximo rendimiento utilizando sólo 65 meq de cofactor por eq de sustrato, lo que significa que un mol de cofactor fue reciclado hasta 10 veces por ciclo de reacción en las condiciones estudiadas. Además, como el biocatalizador fue altamente estable y heterogéneo pudo ser reutilizado durante muchos ciclos de reacción, por tanto, el TTN podría incrementarse. El uso de cofactor FMN o FAD exógeno aumenta la eficiencia catalítica de la enzima regeneradora y gracias al oxígeno molecular (O₂) del medio de reacción el sistema fue capaz de regenerar de forma no enzimática el FMN (Satoshi, 1994).

Además, el sistema tendría margen de optimización, puesto que si se acopla una catalasa al sistema, deberíamos ser capaces de mejorar la estabilidad global de las enzimas involucradas en el sistema. La catalasa sería capaz de eliminar *in situ* el peróxido de hidrógeno formado como subproducto de la Tt27-NOX. De este modo, decrecería la acumulación de este compuesto capaz de inactivar el biocatalizador, lo cual permitiría una optimización de la velocidad de conversión y del rendimiento final.

6. 4. 1. 2. Aplicación del catalizador heterogéneo de Tt27-ADH2 en reducciones asimétricas.

La reducción asimétrica de dos cetonas proquirales, TFA y acetofenona, fue llevada a cabo a pH 7 y 50 °C con el biocatalizador óptimo de Ag-Glx-(Tt27-ADH2) descrito en el **apartado 5. 1. 4** utilizando un derivado de Ag-Glx-(Ps-FDH) (Bolívar et al., 2006) como enzima regeneradora de cofactor. Este sistema, además de presentar unas excelentes propiedades catalíticas y una alta selectividad, también mostró una muy buena estabilidad operacional y fue capaz de reutilizarse durante 4 ciclos de reacción a 30 °C sin alterarse sus propiedades catalíticas (**Figura 5. 41**). Sin embargo, a 50 °C la productividad del sistema se redujo después de su tercer reuso debido posiblemente a la inactivación del catalizador de Ps-FDH. Esta enzima, debido a su origen mesófilo y a pesar de haber sido estabilizada mediante técnicas de inmovilización, presentó una menor estabilidad (vida media a 60 °C pH 7 cercana a las 40 horas) (Bolívar et al., 2006) que el biocatalizador inmovilizado de Tt27-ADH2 (vida media a 80 °C pH 7 cercana a las 90 horas).

Del mismo modo, los derivados inmovilizados de Tt27-ADH2 y Ps-FDH fueron utilizados en la resolución cinética dinámica de la mezcla racémica de 2-fenilpropanal. El sistema bi-enzimático redujo cuantitativamente el aldehído a su correspondiente alcohol primario con un alto *e.e.* hacia el isómero *R* (**Tabla 5. 13**). La biorreducción cuantitativa fue posible ya que los 2-arilpropanales racemizan químicamente a través de un equilibrio ceto-enol desde el aldehído de partida (Galletti et al., 2010). La Tt27-ADH2 es la primera oxidorreductasa descrita que produce preferentemente derivados *R*-profenos, mientras que otras enzimas descritas que reducen 2-arilpropanales producen el enantiómero *S* (Friest et al., 2010; Galletti et al., 2010). Los derivados de *R*-profenos son compuestos muy interesantes para la química farmacéutica por sus propiedades terapéuticas (Allegretti et al., 2005).

Cabe señalar, que en ambos sistemas, el TTN podría incrementarse debido a la alta estabilidad de los biocatalizadores heterogéneos ya que podrían ser reutilizados durante varios ciclos de reacción.

6. 4. 2. Co-inmovilización racional de sistemas bi-enzimáticos en soportes porosos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración *in situ* del cofactor soluble.

Se han diseñado tres sistemas bi-enzimáticos aplicados a diferentes reacciones redox, todos ellos formados por dos DHs, una principal que catalizaba la reacción principal y una DH secundaria que regeneraba el cofactor redox. Estos sistemas bi-enzimáticos se integraron en un único reactor tipo *batch*. Se utilizaron sistemas bi-enzimáticos formados por enzimas inmovilizadas por separado (es decir, cada enzima inmovilizada en una superficie porosa diferente) (**biocatalizador 2-2**) (véase **Esquema 5. 1**), y también sistemas bi-enzimáticos formados por enzimas co-inmovilizadas en el mismo soporte (es decir co-inmovilizadas dentro de la misma superficie porosa) (**biocatalizador 2-1**) (véase **Esquema 5. 2**). En estos estudios se co-inmovilizaron tres sistemas bi-enzimáticos utilizando diferentes químicas de co-inmovilización en base a los rendimientos de inmovilización y de actividad expresada de cada una de las dos enzimas que formaban el sistema. La matriz de inmovilización utilizada en estos experimentos fue

agarosa heterofuncionalmente activada (siempre que fue posible) con grupos glioxil y otros grupos funcionales (Mateo et al., 2010).

6. 4. 2. 1. Co-inmovilización de diferentes sistemas bi-enzimáticos aplicados a reacciones bio-redox con regeneración *in situ* del cofactor soluble.

Las seis diferentes DHs que formaron los tres sistemas bi-enzimáticos estudiados fueron co-inmovilizados utilizando como matriz de la inmovilización agarosa heterofuncionalmente activada con grupos glioxil y grupos quelatos metálicos (Ni^{2+}) (Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx) en aquellos casos donde alguna de las enzimas implicadas estaba marcada con una etiqueta de 6 His (véase **Esquema 5. 2**) o grupos aminos en aquellos caso donde alguna de las enzimas no poseyera etiqueta de His. Sin embargo, la química de la inmovilización no fue universal para todos los sistemas bi-enzimáticos co-inmovilizados. Además, el efecto del proceso de inmovilización sobre la actividad expresada no fue uniforme para las 6 enzimas (véase **Tabla 5. 14**). Idealmente, los 3 sistemas deberían estar formados por catalizadores heterogéneos donde ambas enzimas, la DH principal y la regeneradora, estuvieran unidas covalentemente al soporte para así evitar la liberación de subunidades de las enzimas durante procesos operacionales. Sin embargo, esto no fue posible porque en algunos casos la actividad enzimática fue incompatible con la química de la inmovilización.

En el sistema A, la Gox-GyDH (que no posee etiqueta de 6 His) y la Ps-FDH se inmovilizaron en agarosa activada con grupos glioxil y grupos amino (Ag-A-Glx), pero la Gox-GyDH se inactivó totalmente (véase **Tabla 5. 15**). Por este motivo, la solución fue inmovilizar ambas enzimas (Gox-GyDH y Ps-FDH) sobre un soporte activado únicamente con grupos aminos primarios a pH 7. En este soporte las enzimas, por tanto, estaban unidas al soporte sólido mediante interacciones iónicas reversibles. Mediante esta metodología, que es la que siguen la mayoría de protocolos de co-inmovilizaciones descritas en la bibliografía, ambas enzimas se unen al soporte sin controlar la química de inmovilización óptima para cada una de ellas y su distribución (Betancor et al., 2006; Demir et al., 2011; Gamella et al., 2010; Maurer et al., 2003; Sukyai et al., 2008).

Por otra parte, en el sistema B, la Cb-GyDH (que posee etiqueta de 6 His) y la Tt27-NOX fueron inmovilizadas en Ag-IDA- Ni^{2+} -Glx, la primera de ellas a pH 7 (a través de los grupos quelatos del soporte) y posterior incubación a pH 10 (inmovilización a través química del glioxil) y la Tt27-NOX se inmovilizó a pH 10 (a través de los grupos glioxil del soporte). Mediante esta estrategia la Cb-GyDH se inactivó completamente cuando se incubó en condiciones alcalinas. Por lo tanto, las condiciones alcalinas o la rigidificación promovida por la unión covalente inactivaban la Cb-GyDH. Como solución a la inactivación y para poder controlar su distribución en el soporte, la secuencia de co-inmovilización se invirtió. Así, la Tt27-NOX fue inmovilizada primero a través de la química del glioxil en condiciones alcalinas (véase **Esquema 5. 4**). Una vez unida la Tt27-NOX, la Cb-GyDH fue cuantitativamente y reversiblemente inmovilizada a pH 7 a través de la química de coordinación de los grupos quelatos metálicos del soporte y la etiqueta de 6 histidinas de la DH. Esta inversión de la secuencia de co-

inmovilización permitió recuperar alrededor del 30% de la actividad inmovilizada para ambas enzimas. Así, el sistema B fue formado por unión irreversible de la enzima regeneradora y reversible de la enzima principal (véase **Figura 5. 50**).

Por último, en el sistema C ambas enzimas (Tt27-ADH2 y Tt27-GDH) fueron cuantitativa y covalentemente unidas al soporte conservando un 70 % de sus actividades después del proceso de co-inmovilización (véase **Tabla 5. 15** y **Esquema 5. 5**).

Este esquema de inmovilización puede ser una interesante aproximación para su uso en plataformas microfluídicas con el propósito de evaluar diferentes DHs para una determinada reacción acoplados a un sistema intrínseco de regeneración del cofactor. En este contexto, diferentes DHs principales podrían ser adaptadas fácilmente, mientras que la DH regeneradora sería la misma independientemente de la DH principal (Bolívar et al., 2011b).

Por lo tanto, se ha demostrado como la inmovilización de sistemas multienzimáticos no es trivial, la química de la unión enzima-soporte afecta directamente a la co-inmovilización de enzimas. De este modo, la inmovilización reversible *vía* intercambio iónico preserva la actividad de ambas DHs del sistema A, mientras que la inmovilización covalente e irreversible de las dos DHs que forman el sistema C dan lugar a un biocatalizador bi-enzimático activo. A diferencia de los sistemas anteriores, el sistema B sólo mostró actividad de ambas enzimas cuando la enzima regeneradora se inmovilizó covalentemente y la enzima principal se inmovilizó reversiblemente *vía* química IMAC.

6. 4. 2. 2. La co-inmovilización de los sistemas bi-enzimáticos mejora la eficiencia de la regeneración de cofactor redox.

La eficiencia de regeneración de los cofactores redox fue analizada para los tres sistemas descritos anteriormente comparando el biocatalizador 2-2 y el biocatalizador 2-1 en el **apartado 5. 5. 2**. En condiciones de baja concentración del cofactor, el biocatalizador co-inmovilizado 2-1 presentó una mayor frecuencia total de recambio (TOF) del correspondiente cofactor redox con respecto al biocatalizador 2-2 (véase **Figura 5. 51**). Utilizando biocatalizadores 2-1, los cofactores no parecen difundir al medio y consecuentemente la concentración efectiva de cofactor alrededor de la DH principal podría ser mayor. Este hecho también fue apoyado por los valores de K_m aparentes de las DH principales co-inmovilizadas del modo 2-1, el cual fue más bajo que la K_m real de la enzima soluble sin sistema de regeneración (véase **Tabla 5. 16**). Por el contrario, el biocatalizador 2-2 mostró valores de K_m de la DH principal similares (sistema A) o mucho mayores (sistema B y C) que la enzima soluble. La menor eficiencia de regeneración del cofactor usando el biocatalizador 2-2 parece ser debido a la dilución subyacente que experimenta el cofactor cuando difunde desde una partícula porosa donde se oxida para diluirse en el medio de reacción y difundir de nuevo al interior de otra partícula porosa para ser regenerado. Por tanto, el recorrido que tiene que realizar el cofactor para ser reciclado va a disminuir la

disponibilidad del cofactor redox en el estado de oxidación correcto para que se lleve a cabo la reacción principal (**Esquema 5. 1**).

Sin embargo, aunque la co-inmovilización de la enzima regeneradora y la DH principal mejora la eficiencia del reciclaje del cofactor redox, las mejoras fueron mayores o menores dependiendo del sistema. En el sistema A, las diferencias en el TTN/h entre el biocatalizador 2-1 y 2-2 (véase **Figura 5. 51A**) fueron las más pequeñas encontradas en estos experimentos, principalmente porque el biocatalizador 2-2 fue capaz unir el cofactor con la misma afinidad aparente que la Gox-GyDH soluble (véase **Tabla 5. 16**). De hecho, los valores de TTN/h del biocatalizador 2-2 fueron lo más altos de los tres sistemas estudiados. Por el contrario, la regeneración de NAD^+ fue bastante ineficiente porque la Cb-GyDH sufrió inhibición por su producto como ocurre en otras Gy-DHs (Bauer et al., 2005; Spencer et al., 1989; Strickland and Miller, 1968; Yamada et al., 1982). Aun así, el biocatalizador 2-1 fue capaz de incrementar 4,8 veces el TTN/h en condiciones de baja concentración de cofactor con respecto al biocatalizador 2-2 (véase **Figura 5. 51B**) y disminuyó 12 veces el valor de K_m aparente de la Cb-GyDH co-inmovilizada (**Tabla 5. 16**) comparada con la misma enzima inmovilizada por separado. A pesar de la inhibición por producto, la optimización del protocolo de co-inmovilización supera parcialmente las malas propiedades catalíticas de la Cb-GyDH.

Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron con el sistema C, donde la co-inmovilización de las dos enzimas (biocatalizador 2-1) mejoró 13 veces la regeneración del NADH con respecto al biocatalizador 2-2 (véase **Figura 5. 51C**). Tales resultados fueron obtenidos usando una solución de 0,5 μM de NADH (50 microequivalentes de cofactor por equivalente de sustrato). En este escenario, la *Tt27-ADH2* co-inmovilizada con la *Tt27-GDH* en $\text{Ag-Ni}^{2+}/\text{G}$ (biocatalizador 2-1) unió aparentemente el cofactor con una afinidad 17,5 veces mayor que cuando la DH principal fue inmovilizada por separado (biocatalizador 2-2). Esta gran eficacia para regenerar el NADH pudo deberse a la óptima co-inmovilización de las dos enzimas que formaban el sistema C en términos tanto de estabilidad como de actividad. No obstante, la co-inmovilización secuencial de la *Tt27-GDH* a pH 7 y la *Tt27-ADH2* a pH 10 en $\text{Ag-IDA-Ni}^{2+}\text{-Glx}$ condujo a que ambas enzimas fueran altamente estabilizadas por la unión covalente multipuntual con una óptima orientación (Bolívar et al., 2009a; Rocha-Martín et al., 2012).

Por tanto, el hecho de inmovilizar dos o más enzimas en un poro y en una partícula sólida tiene grandes beneficios para la catálisis en cascada porque los sustratos y el cofactor no difunden fuera del material poroso lo que incrementaría su concentración alrededor de las moléculas de enzima que forman el sistema catalítico. Sin embargo, la efectividad final de la inmovilización de los sistemas bio-redox recae en las propiedades cinéticas intrínsecas del sistema y el diseño de la inmovilización.

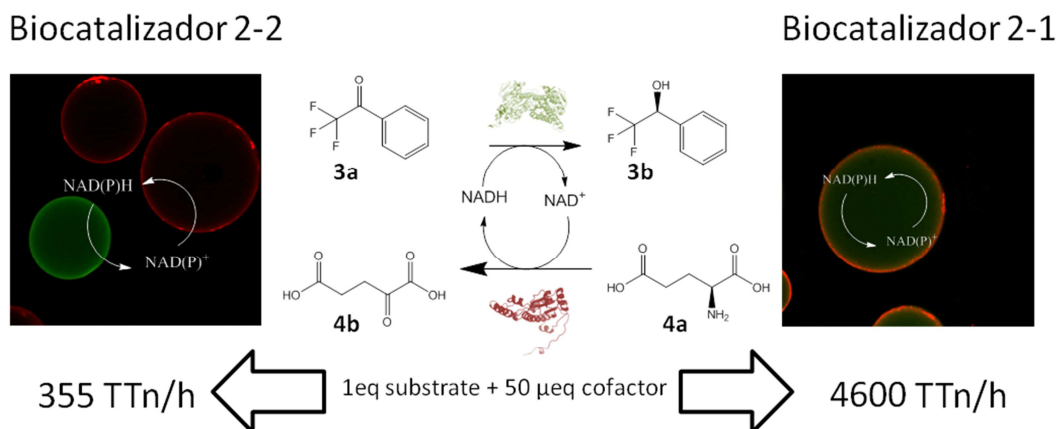


Figura 6. 10. Eficiencia de la regeneración del cofactor en el sistema bi-enzimático C (Tt27-ADH2/Tt27-GDH).

6. 4. 2. 3. La localización espacial de cada una de las deshidrogenasas a lo largo de la superficie porosa afecta a la eficiencia de la regeneración in-situ del cofactor.

El control de la velocidad de inmovilización de cada proteína que forma parte de un sistema bio-redox, modifica el patrón de distribución espacial y de co-inmovilización a través de la superficie porosa, y es un parámetro importante para controlar el rendimiento catalítico del biocatalizador heterogéneo final (Bolívar et al., 2011a). Con el fin de determinar la distribución de cada enzima dentro del poro del soporte, sus extremos N-terminal fueron marcados con fluorescamina (verde) en el caso de la Tt27-ADH2 y con rodamina B (roja) la Tt27-GDH. Las proteínas etiquetadas con estos fluoróforos fueron co-inmovilizadas e inmovilizadas por separado en Ag-Ni^{2+} -Glx y los biocatalizadores 2-1 y 2-2 resultantes fueron analizados por microscopía láser confocal de barrido (CLMS).

En la **Figura 5. 52** se mostró como en los biocatalizadores 2-2, Tt27-ADH2 y Tt27-GDH fueron inmovilizados en diferentes partículas, de este modo las dos enzimas no compartieron nunca la misma superficie porosa. Por el contrario, cuando ambas proteínas fueron co-inmovilizadas en el mismo soporte, localizaron en la misma partícula. Este hecho explicaría visualmente porque el reciclaje del cofactor fue mucho más eficiente en el biocatalizador 2-1, ya que el cofactor no tuvo que difundir fuera del poro para ser reciclado. Sin embargo, en el sistema co-inmovilizado, ambas DHs se distribuyeron a lo largo de la partícula porosa de forma diferente. La Tt27-GDH se distribuyó heterogéneamente, localizándose en el borde de la partícula (superficie más exterior de los poros). Mientras que la Tt27-ADH2, se distribuyó de forma más homogénea a lo largo de toda la superficie de la partícula (véase **Figura 5. 52B**).

Como se ha comentado anteriormente, la velocidad de inmovilización puede controlar la distribución de las proteínas dentro de superficies porosas (Bolívar et al., 2011a). Así, la distribución desigual de ambas DHs puede ser explicada porque ambas enzimas fueron inmovilizadas con diferente velocidad de inmovilización en el mismo soporte (Ag-Ni^{2+} -Glx). En este sentido, ambas proteínas estaban

co-localizadas a nivel microscópico (las dos enzimas inmovilizadas en la misma partícula porosa) pero no a nivel nanoscópico (diferente localización dentro de la microestructura de la partícula porosa). Para optimizar la distribución dentro de los poros de las DHs que componían el sistema C, se alteró la distribución de la Tt27-GDH modificando su velocidad de inmovilización. Por consiguiente, se ralentizó la inmovilización en Ag-Ni²⁺-Glx mediante la presencia de imidazol que compite con las His de la enzima para formar enlaces de coordinación con los quelatos metálicos (Vunnum et al., 1995). Por tanto, la metodología de inmovilización determinó la localización espacial de Tt27-ADH2 y Tt27-GDH a lo largo de la partícula porosa. La localización visual de los diferentes enzimas inmovilizadas (**Figura 5. 53**) permitió calcular los diferentes parámetros relacionados con la localización de cada enzima involucrada en el sistema C (véase **Tabla 6. 1**).

Cabe destacar, como el radio ocupado y por tanto la superficie ocupada por cada proteína fue diferente según sus velocidades de inmovilización. Cuando la Tt27-GDH fue inmovilizada a pH 7 su distribución fue heterogénea ocupando sólo un 1,5 % del total de la superficie porosa mientras que en presencia de 0,2 M de imidazol, su distribución fue más homogénea, estando distribuida a lo largo de la superficie porosa. Esta distribución diferencial basada en las diferentes condiciones de inmovilización también se reflejó en la densidad de proteína por área del soporte. Mientras cada molécula de Tt27-GDH estuvo separada de otra por una distancia de 3 nm en el caso de una distribución heterogénea, cuando esta enzima fue distribuida heterogéneamente, tal separación se incrementó hasta 30 nm.

Por lo tanto, en el contexto de una partícula porosa, la distribución diferencial de ambas enzimas no sería la óptima para el reciclaje *in situ* del cofactor redox donde sólo el 1,5 % de Tt27-ADH2 ($5 \cdot 10^8$ moléculas) co-localizaron con el 100 % de Tt27-GDH ($3,9 \cdot 10^{10}$ moléculas) (véase **Tabla 6. 1**). En este contexto, la regeneración del cofactor sería altamente eficiente sólo para el 1,5 % de la Tt27-ADH2 (1 molécula de Tt27-ADH2 rodeada de 78 moléculas de Tt27-GDH). Para el otro 98,5 % de Tt27-ADH2, la regeneración del cofactor no sería tan eficiente porque la enzima regeneradora no estaría rodeando la DH principal (**Figura 5.52B**).

Por el contrario, cuando la inmovilización de la Tt27-GDH fue ralentizada mediante el uso de imidazol, esta enzima se distribuyó de forma más homogénea y co-localizó mayormente con la enzima principal (Tt27-ADH2) a lo largo de toda la superficie porosa (**Figura 5. 52C**). En este biocatalizador heterogéneo, aproximadamente el 100 % de las moléculas de la Tt27-ADH2 co-localizaron con el 100 % de las moléculas de Tt27-GDH inmovilizadas, de modo que cada molécula de DH principal fue rodeada, en toda la superficie porosa, por al menos 1,5 moléculas de la DH regeneradora (**Tabla 6. 1**).

	Enzimas	j (moléculas/ partícula)	r _i (μm)	r _o (μm)	S _o (cm ² / partícula)	D (moléculas/μm ²)	d (nm)	j _{col}	C (%)
A	Ti27-GDH	3,9* 10 ¹⁰	63±4	6,3±2,1	1,75	220	3	3,9* 10 ¹⁰	-
	Ti27-ADH2	2,6* 10 ¹⁰	63±4	63±4	87,8	2,97	34	5*10 ⁸	1,5
B	Ti27-GDH	3,9* 10 ¹⁰	63±4	63±4	87,8	4,46	30	3,9* 10 ¹⁰	100
	Ti27-ADH2	2,6* 10 ¹⁰	63±4	63±4	87,8	2,97	34	2,6* 10 ¹⁰	-

Tabla 6. 1. Parámetros relacionados con la localización de cada enzima involucrada en sistema bio-redox C. (A) Ti27-GDH inmovilizada en Ag-Ni²⁺-Glx a pH 7 y Ti27-ADH2 inmovilizada a pH 10 en la misma superficie. (B) Ti27-GDH inmovilizada en Ag-Ni²⁺-Glx a pH 7 en presencia de 0,2 M de imidazol y Ti27-ADH2 inmovilizada a pH 10 con imidazol en la misma superficie. (j): densidad de moléculas inmovilizadas por partícula de soporte. (r_i): radio total de las partículas de agarosa medido con el software Image J. (r_o): radio ocupado por la proteína medida con el software Image J. (S_o): superficie ocupada por la proteína calculado en base a r_o. (D): densidad de moléculas por superficie ocupada. D= j/ S_o (d): distancia de separación entre dos moléculas de la misma enzima. (j_{col}): número de moléculas de la enzima correspondiente que co-localizaron con su correspondiente socio dentro de una partícula [j_{col} = j(n)*S_o(Ti27-GDH)/S_o(n); donde n es la enzima correspondiente]. (C): porcentaje de moléculas de Ti27-ADH2 que co-localizaron con todas las moléculas de Ti27-GDH inmovilizada.

En la **Figura 5. 52C** pudo observarse como cuando ambas enzimas co-localizaron a lo largo de toda la superficie porosa (distribución homogénea de ambas DHs) (15 m²/g), la regeneración de NADH en condiciones de baja concentración de cofactor fue hasta 1,5 veces más eficiente que cuando ambas enzimas se distribuyeron de forma diferencial. Como consecuencia, co-localizaron parcialmente en una superficie más pequeña (0,3 m²/g). Además, el sistema co-inmovilizado donde las dos enzimas co-localizaron a lo largo de toda la superficie porosa, dio lugar a una K_m aparente para la DH principal de 1,25 veces más baja que la observada en el sistema co-inmovilizado con una diferente distribución de cada una de las proteínas.

Por tanto, la distribución homogénea de las dos enzimas dio lugar a un biocatalizador bi-enzimático inmovilizado que llevó a cabo la reacción de un modo más eficiente, porque tanto la DH principal como la regeneradora co-existieron en la totalidad de la superficie porosa. En otras palabras, ambas enzimas eran vecinas y consecuentemente el cofactor no sólo se reciclaba dentro de la misma partícula (en un mismo ambiente micrométrico) sino también dentro del mismo entorno nanométrico de la DH principal, lo que supuso un incremento aún mayor de la concentración efectiva de NADH alrededor de la enzima principal.

6. 4. 2. 4. La co-inmovilización del sistema tiene efecto en el impacto del exceso de enzima regeneradora en la eficiencia de la regeneración del cofactor.

Puede asumirse que una mayor proporción molar DH regeneradora/DH principal mejora la regeneración del cofactor durante el proceso bio-redox. Sin embargo, hay pocos estudios acerca de cómo afecta la co-inmovilización de ambas enzimas en la misma superficie porosa a la proporción DH regeneradora/DH principal óptima. Para demostrar tal efecto, se utilizó el sistema C estudiando diferentes proporciones de Tt27-GDH/Tt27-ADH2. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo mediante la reducción asimétrica de 2,2',2''-trifluoroacetofenona utilizando 0,5 μ M de NADH. Como era de esperar, el mayor TTN/h fueron obtenidos con el biocatalizador 2-1 co-inmovilizado, con un TTN/h de 9000 cuando la proporción Tt27-GDH/Tt27-ADH2 fue 5 (véase **Figura 5. 55**). Esta eficiencia de la regeneración es uno de los valores más altos que hemos encontrado descritos en la bibliografía para la regeneración de cofactores redox solubles (Betancor et al., 2006; Maurer et al., 2003; Zhang et al., 2011) y muy cercanos a los obtenidos con cofactores en fase sólida (Liu and Wang, 2007).

La otra conclusión interesante que se deduce de la **Figura 5. 55**, fue que el impacto de la relación molar Tt27-GDH/Tt27-ADH2 en la eficiencia de la regeneración fue menor cuando ambas enzimas estaban co-inmovilizadas. En un análisis más profundo esta figura, puede observarse como la co-inmovilización optimiza la eficiencia de la regeneración del cofactor tanto que reduce el impacto positivo del exceso de enzima regeneradora en la eficiencia de la regeneración de cofactor. En otras palabras, en los sistemas co-inmovilizados podemos reducir la cantidad de DH regeneradora con respecto a la cantidad de DH principal sin afectar significativamente a la eficiencia de la regeneración.



Conclusiones

7. CONCLUSIONES.

A modo de resumen de la presente Tesis Doctoral se pueden resaltar algunas de las siguientes conclusiones más relevantes:

1.- Purificación de enzimas recombinantes de *Thermus thermophilus*. Cuando estas enzimas se expresan de forma recombinante en *E.coli* son muchísimo más estables térmicamente que las proteínas del hospedador. De este modo, se diseñaron tratamientos térmicos muy drásticos (45-60 minutos a 70-80 °C) que permitieron obtener rendimientos de purificación muy altos (80-99 %) con factores de purificación muy interesantes (entre 10 y 15). La purificación adicional hasta obtener enzimas electroforéticamente puras (factores de estabilización de 17-24 veces) se consiguió por adsorción selectiva de las proteínas remanentes de *E.coli* en potentes adsorbentes. En estas condiciones las enzimas termófilas no fueron adsorbidas.

2.- Propiedades bioquímicas y biotecnológicas de Tt27-ADH2. Esta enzima fue clonada y expresada *E. coli*. La enzima puede utilizar tanto NADH como NADPH como cofactores, si bien, fue 6 veces más activa hacia el NADH. Su temperatura óptima fue de 85 °C y presentó una buena actividad (7,5 U/mg) a temperatura baja (30 °C) y pH 7 (pH óptimo) frente a su mejor sustrato (2,2',2''-trifluoreacetofenona). La enzima fue mejor catalizador de reducción que de oxidación.

3.- Propiedades bioquímicas y biotecnológicas de Tt27-NOX. Se clonaron y expresaron en *E. coli* 6 variantes diferentes de Tt27-NOX. La variante KHY, una de las variantes más activas y estables, se estudió más en profundidad. La enzima presentó una cierta actividad oxidasa en ausencia de FAD o FMN exógenos y una eficiencia catalítica 6 veces mayor que su homóloga de la cepa HB8 descrita por Park y col. Estas moléculas de enzima tienen el cofactor fuertemente unido y no se desorbe durante diálisis de la enzima soluble, ni durante lavados intensos de los derivados. A pesar de ello, la actividad tanto de la enzima soluble como la enzima inmovilizada aumentó unas 350 veces en presencia de bajas concentraciones de FAD o FMN exógeno (150 µM). La enzima con cofactor exógeno presentó una actividad específica cercana a 70 U/mg a 25 °C y pH 7, por ello, esta enzima podría resultar muy útil como enzima regeneradora de NAD⁺ en cualquier proceso de oxidación de cualquier sustrato lábil o no.

4.- Glicerol deshidrogenasa de *Citrobacter braakii*. Esta enzima fue clonada y expresada en *E. coli*. La enzima fue capaz de oxidar glicerol a dihidroxiacetona con una actividad específica de 65 U/mg a pH 9 y 30 °C. Sufrió una fuerte inhibición no competitiva por bajas concentraciones del producto de oxidación (DHA). La inhibición dependió del pH: a pH 9 la inhibición fue 10 veces menor que a pH 7. Mediante la inmovilización de la enzima en soportes agarosa heterofuncionalmente activados con grupos glioxil y grupos quelatos metálicos la inhibición fue 1,7 veces menor con respecto a la enzima soluble.

5.- Inmovilización de las enzimas sobre soportes agarosa activados con grupos glioxil. Las tres principales enzimas estudiadas se inmovilizaron mediante diferentes estrategias de inmovilización reversibles e irreversibles. Los derivados más estables se consiguieron mediante unión covalente multipuntual sobre soportes agarosa glioxil. Los factores de estabilización de los derivados inmovilizados óptimos, con respecto a las estabildades de sus correspondientes enzimas solubles (puras y diluídas para evitar artefactos indeseables) fueron: la Tt27-ADH2 inmovilizada fue hasta 200 veces más estable a pH 5 y 80 °C que la enzima soluble; la Cb-GyDH inmovilizada fue hasta 90 veces más estable a pH 7 y 65 °C que la enzima soluble; y la Tt27-NOX inmovilizada fue hasta 20 veces más estable a pH 9 y 80 °C que la enzima soluble.

6.- Estabilización de la estructura cuaternaria. La estructura cuaternaria de la enzima dimérica Tt27-ADH2 se estabilizó por unión covalente multipuntual. Sin embargo, la estructura cuaternaria de Tt27-NOX no se estabilizó completamente mediante inmovilización en agarosa glioxil y fue necesario un entrecruzamiento adicional con un polímero polifuncional (dextrano-aldehído) para lograr su estabilización completa. De este modo, la enzima se estabilizó cerca de 300 veces a pH 5,0 y 80 °C, donde su inactivación estaba promovida por la disociación de subunidades.

7.- Desplegamiento-replegamiento: reactivación de los catalizadores después de su inactivación. En general, los derivados estabilizados por unión covalente multipuntual se desplegaron en disoluciones saturantes de guanidina y recuperaron prácticamente toda su actividad (más del 80 %) cuando se replegaron en medios acuosos a pH neutro y 65 °C (en el caso de Tt27-NOX) o temperatura ambiente (en el caso de Tt27-ADH2). Por el contrario, los derivados BrCN Sepharose®, donde las enzimas fueron inmovilizados en condiciones suaves, apenas se replegaron correctamente y sólo recuperaron cerca del 20% de su actividad inicial. Del mismo modo, tras la inactivación total de los derivados en medios con altos porcentajes de disolventes orgánicos (50-60 %), pH 5 y 37°C, se logró recuperar el 90 % de la actividad de Tt27-NOX y el 50 % Tt27-ADH2, incluso sin necesidad de desplegar las estructuras incorrectas con guanidina, por simple re-incubación en medio acuoso a pH neutro y 65 °C (Tt27-NOX) o temperatura ambiente (Tt27-ADH2).

8.- Procesos redox con regeneración *in situ* de cofactores mediante sistemas bi-enzimáticos.

Se ha logrado coordinar satisfactoriamente una deshidrogenasa principal con una deshidrogenasa regeneradora de cofactor redox en las siguientes reacciones redox:

a.- Oxidación enantioselectiva de (*rac*)-1-feniletanol. Se utilizaron biocatalizadores heterogéneos y altamente estables de Tt27-NOX y Tt27-ADH1 inmovilizados de forma separada en agarosa glioxil. El catalizador de Tt27-NOX fue utilizado como enzima regeneradora de NAD^+ acoplado a un catalizador de Tt27-ADH1. La selectividad de la deshidrogenasa principal fue extremadamente alta y este sistema bi-enzimático fue capaz de oxidar enantioselectivamente el isómero (*S*)-(-)-1-feniletanol a acetofenona, reduciendo el NAD^+ a NADH, alcanzando un 99 % de exceso enantiomérico de (*R*)-(+)-1-feniletanol con un 50 % de conversión. El número total de recambio (TTN) del NAD^+ por cada ciclo de reacción fue 10 (un mol de cofactor fue reciclado hasta 10 veces por ciclo de reacción) en las condiciones estudiadas.

b.- Reducción asimétrica de la 2,2',2''-trifluoroacetofenona (TFA). Se utilizaron biocatalizadores heterogéneos y altamente estables de Tt27-ADH2 y Ps-FDH inmovilizados de forma separada en agarosa glioxil. El catalizador de Ps-FDH fue utilizado como enzima regeneradora de NADH acoplado al catalizador de Tt27-ADH2. Este sistema fue capaz de llevar a cabo la reducción asimétrica de la TFA de forma cuantitativa produciendo el alcohol secundario correspondiente con un exceso enantiomérico superior al 96 % hacia el alcohol (*S*)-(+)- α -(trifluorometil)benílico. El número total de recambio (TTN) del NADH fue 20 por cada ciclo de reacción en las condiciones estudiadas.

c.- Resolución cinética dinámica del (*rac*)-2-fenilpropanal. Se utilizaron biocatalizadores heterogéneos y altamente estables de Tt27-ADH2 y Ps-FDH inmovilizados de forma separada en agarosa glioxil. El catalizador de Ps-FDH fue utilizado como enzima regeneradora de NADH acoplado al catalizador de Tt27-ADH2. Se obtuvieron conversiones del 100% debido a la racemización continua del sustrato sin reaccionar y se obtuvo un exceso enantiomérico cercano al 70 %. Este exceso enantiomérico se pudo mejorar por ingeniería del medio de reacción: en presencia de entre 5-15 % de ACN la velocidad de la reacción fue menor a medida que aumentó la concentración de ACN, pero se obtuvo un 100 % de conversión y unos excesos enantioméricos cercanos al 90 % hacia el (*R*)-2-fenil-1-propanol. El número total de recambio (TTN) del NADH fue de 10 por cada ciclo de reacción en las condiciones estudiadas.

9.- Regeneración de cofactor utilizando una deshidrogenasa regeneradora co-inmovilizada junto a la deshidrogenasa principal dentro de la misma superficie porosa. En este caso la enzima regeneradora de cofactor actuó dentro del mismo poro del soporte donde se produce la oxidación o reducción del mismo. Por tanto, las concentraciones de cofactor en el entorno de la enzima regeneradora fueron mucho mayores que en el caso anterior, donde cada enzima fue inmovilizada en una superficie porosa diferente. En este último caso, el cofactor se oxida o reduce en el sólido poroso donde se encuentra la enzima principal, difunde desde esa partícula porosa al tanque de reacción donde se diluye y finalmente penetra para ser regenerado en otro sólido poroso donde se encuentra la enzima regeneradora.

En el caso de catalizadores formados por dos enzimas co-inmovilizadas en la misma superficie porosa, el número total de recambio del cofactor mejoró notablemente. Por ejemplo, el número total de recambio del NADH por hora (TTN/h) fue de 4600 para el sistema bi-enzimático co-inmovilizado Tt27-ADH2/Tt27-GDH con 50 microequivalentes de cofactor por equivalente de sustrato, mientras que para el mismo sistema bi-enzimático pero inmovilizado por separado y en las mismas condiciones el TTN/h del NADH fue 355.

10.- Regeneración de cofactor utilizando una deshidrogenasa regeneradora co-inmovilizada, junto a la deshidrogenasa principal dentro de la misma superficie porosa y con una misma distribución espacial de las dos enzimas en el interior de la estructura porosa. Se ha logrado controlar la distribución espacial de las enzimas en los sistemas co-inmovilizados, incluso a nivel nanométrico, obteniendo catalizadores donde todas las enzimas co-localizaron y otros donde la mayor parte de la deshidrogenasa principal estaba alejada de la deshidrogenasa regeneradora.

De este modo, el diseño de procesos de inmovilización de dos enzimas con la misma velocidad de inmovilización en el sólido poroso, provocó que las dos enzimas se distribuyeran homogéneamente a lo largo de la misma superficie porosa. En este caso, la eficiencia de la regeneración fue todavía mayor, sobre todo a bajas concentraciones de cofactor, mejorando 1,5 veces el TTN/h con respecto a las dos enzimas distribuidas heterogéneamente a lo largo de la misma superficie porosa.



Bibliografía

- Allegretti, M., Bertini, R., Cesta, M.C., Bizzarri, C., Di Bitondo, R., Di Cioccio, V., Galliera, E., Berdini, V., Topai, A., Zampella, G., Russo, V., Di Bello, N., Nano, G., Nicolini, L., Locati, M., Fantucci, P., Florio, S., Colotta, F. 2005. 2-Arylpropionic CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) ligands as novel noncompetitive CXCL8 inhibitors. *J. Med. Chem.* 48, 4312-4331.
- Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M., Williamson, T.C. 2001. Catalysis as a foundational pillar of green chemistry. *Appl. Catal. A-Gen.* 221, 3-13.
- Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M. 2002. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc. Chem. Res.* 35, 686-694.
- Anastas, P.T., Zimmerman, J.B. 2003. Design through the 12 principles of green engineering. *Environ. Sci. Technol.* 37, 94-101.
- Arica, M.Y., Bayramoğlu, G. 2006. Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine-grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 38, 131-138.
- Armisen, P., Mateo, C., Cortes, E., Barredo, J.L., Salto, F., Diez, B., Rodes, L., Garcia, J.L., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 1999. Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports. *J. Chromatogr. A.* 848, 61-70.
- Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S., Hekmat, D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 28, 37-43.
- Baumeister, A., Vogelmann, S., Fischer, L. 2003. Concentration and purification of orotic acid directly from whey with an expanded bed adsorption system. *J. Chromatogr.* 1006, 261-265.
- Berenguer-Murcia, A., Fernandez-Lafuente, R. 2010. New trends in the recycling of NAD(P)H for the design of sustainable asymmetric reductions catalyzed by dehydrogenases. *Curr. Org. Chem.* 14, 1000-1021.
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2003. Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase using immobilization and postimmobilization techniques. *Biotechnol. Progr.* 19, 763-767.
- Betancor, L., Berne, C., Luckarift, H.R., Spain, J.C. 2006. Coimmobilization of a redox enzyme and a cofactor regeneration system. *Chem. Commun.* 3640-3642.
- Betancor, L., Luckarift, H.R. 2010. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 27, 95-114.
- Bolen, D.W. 2004. Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization. *Methods.* 34, 312-322.
- Bolivar, J.M., Wilson, L., Ferrarotti, S.A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., Mateo, C. 2006. Stabilization of a formate dehydrogenase by covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose supports. *Biomacromolecules* 7, 669-673.
- Bolivar, J.M., Wilson, L., Ferrarotti, S.A., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., Mateo, C. 2007. Evaluation of different immobilization strategies to prepare an industrial biocatalyst of formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 540-546.
- Bolivar, J.M., Cava, F., Mateo, C., Rocha-Martin, J., Guisan, J.M., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R. 2008. Immobilization-stabilization of a new recombinant glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 49-58.
- Bolivar, J.M., Rocha-Martin, J., Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Vega, D., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2009a. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 58, 158-163.
- Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Godoy, C., Rodrigues, D.S., Rodrigues, R.C., Batalla, P., Rocha-Martín, J., Mateo, C., Giordano, R.L.C., Guisán, J.M. 2009b. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: new strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 477-483.

- Bolivar, J.M., Mateo, C., Rocha-Martin, J., Cava, F., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2009c. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 139-144.
- Bolivar, J.M., Rocha-Martin, J., Godoy, C., Rodrigues, R.C., Guisan, J.M. 2010. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Process Biochem.* 45, 107-113.
- Bolivar, J.M., Hidalgo, A., Sánchez-Ruiloba, L., Berenguer, J., Guisán, J.M., López-Gallego, F. 2011a. Modulation of the distribution of small proteins within porous matrixes by smart-control of the immobilization rate. *J. Biotechnol.* 155, 412-420.
- Bolivar, J.M., Wiesbauer, J., Nidetzky, B. 2011b. Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream? *Trends Biotechnol.* 29, 333-342.
- Boyd, D.R., Sharma, N.D., Ljubez, V., Malone, J.F., Allen, C.C.R. 2007. Tandem enzyme-catalysed reduction cis-dihydroxylation of 2,2,2-trifluoroacetophenone: chemoenzymatic routes to new enantiopure phenol and benzylic alcohol reagents. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 1072-1081.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandt, R.B., Laux, J.E., Yates, S.W. 1987. Calculation of inhibitor K_i and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50% inhibition for Michaelis-Menten enzymes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 37, 344-349.
- Burton, S.G. 2003. Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* 21, 543-549.
- Cao, L., van Langen, L., Sheldon, R.A. 2003. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free?. *Curr. Opin. Biotech.* 14, 387-394.
- Cao, L., 2005. Immobilised enzymes: Science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 217-226.
- Cava, F., Hidalgo, A., Berenguer, J. 2009. *Thermus thermophilus* as biological model. *Extremophiles* 13, 213-231.
- Cer, R.Z., Mudunuri, U., Stephens, R., Lebeda, F.J., 2009. IC50-to-Ki: A web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Res.* 37, 441-445.
- Chen W., Tong X., Dong X., Sun Y. 2003. Expanded bed adsorption of protein with DEAE spherodex M. *Biotechnol. Progr.* 19:880-886.
- Chenault, H.K., Simon, E.S., Whitesides, G.M. 1988. Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 6, 221-270.
- Chua, L.S., Sarmidi, M.R. 2004. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 28, 111-119.
- Cleland, W.W. 1967a. Enzyme kinetics. *Annu. Rev. Biochem.* 36, 77-112.
- Cleland, W.W. 1967b. The statistical analysis of enzyme kinetic data. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 29, 1-32.
- Creanga, C., El Murr, N. 2011. Development of new disposable NADH biosensors based on NADH oxidase. *J. Electroanal. Chem.* 656, 179-184.
- Coolbear T., Daniel R., Morgan H. 1992. The enzymes from extreme thermophiles: Bacterial source, thermostabilities and industrial relevance. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 45, 57-98.
- Cowan, D.A. 1997. Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. *Comp. Biochem. Phys. A.* 118, 429-438.
- Curiel, J.A., de las Rivas, B., Mancheño, J.M., Muñoz, R. 2011. The pURI family of expression vectors: A versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein Expres. Purif.* 76, 44-53.
- da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27, 30-39.
- Daniel, R., Stuetz, K., Gottschalk, G. 1995. Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* 177, 4392-4401.
- Daniel, R.M., Cowan, D.A. 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 250-264.
- De Levie, R., 2001. How to use Excel in analytical chemistry and in general scientific data analysis. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

- Demir, A.S., Talpur, F.N., Betul Sopaci, S., Kohring, G.W., Celik, A. 2011. Selective oxidation and reduction reactions with cofactor regeneration mediated by galactitol-, lactate-, and formate dehydrogenases immobilized on magnetic nanoparticles. *J. Biotechnol.* 152, 176-183.
- Devaux-Basseguy, R., Bergel, A., Comtat, M. 1997. Potential applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases in synthesis: A survey. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 248-258.
- Enders, D., Voith, M., Lenzen, A., 2005. The dihydroxyacetone unit - A versatile C₃ building block in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit.* 44, 1304-1325.
- Faber, K. 2006. *Biotransformations in organic chemistry*. 6th Edition. Ed., Springer-Verlag. Berlin.
- Facchiano, F., Ragone, R., Porcelli, M., Cacciapuoti, G., Colonna, G. 1992. Effect of temperature on the propylamine transferase from *Sulfolobus solfataricus*, an extreme thermophilic archaeobacterium. 1. Conformational behavior of the oligomeric enzyme in solution. *Eur. J. Biochem.* 204, 473-482.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Rodriguez, V., Santana, C., Soler, G., Bastida, A., Guisan, J.M. 1993. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 546-550.
- Fernandez-Lafuente, R., Rosell, C.M., Caanan-Haden, L., Rodes, L., Guisan, J.M. 1999. Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 96-103.
- Fernandez-Lafuente, R., Hernández-Jústiz, O., Mateo, C., Terreni, M., Alonso, J., Garcia-López, J.L., Moreno, M.A., Guisan, J.M., 2001. Stabilization of a tetrameric enzyme (α -amino acid ester hydrolase from *Acetobacter turbidans*) enables a very improved performance of ampicillin synthesis. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11, 633-638.
- Fernandez-Lafuente, R. 2009. Stabilization of multimeric enzymes: strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 405-418.
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.* 277, 25677-25684.
- Friest, J.A., Maezato, Y., Broussy, S., Blum, P., Berkowitz, D.B. 2010. Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric catalysis-dynamic reductive kinetic resolution entry into (S)-profens. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5930-5931.
- Fuentes, M., Pessela, B.C.C., Maquiese, J.V., Ortiz, C., Segura, R.L., Palomo, J.M., Abian, O., Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2004. Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. *Biotechnol. Progr.* 20, 1134-1139.
- Filling, C., Berndt, K.D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. 2002. Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Biol. Chem.* 277, 25677-25684.
- Friest, J.A., Maezato, Y., Broussy, S., Blum, P., Berkowitz, D.B. 2010. Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric catalysis-dynamic reductive kinetic resolution entry into (S)-profens. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5930-5931.
- Fuentes M., Maquiese J., Pessela B., Abian O., Fernández-Lafuente R., Mateo C., Guisán, J. M. 2004a. New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins. *Biotechnol. Progr.* 2004; 20:284-288.
- Fuentes, M., Pessela, B.C.C., Maquiese, J.V., Ortiz, C., Segura, R.L., Palomo, J.M., Abian, O., Torres, R., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2004b. Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. *Biotechnol. Progr.* 20, 1134-1139.
- Galletti, P., Emer, E., Gucciardo, G., Quintavalla, A., Pori, M., Giacomini, D. 2010. Chemoenzymatic synthesis of (2S)-2-arylpropanols through a dynamic kinetic resolution of 2-arylpropanals with alcohol dehydrogenases. *Org. Biomol. Chem.* 8, 4117-4123.
- Gamella, M., Campuzano, S., Conzuelo, F., Curiel, J.A., Munoz, R., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2010. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in wines. *Talanta* 81, 925-933.
- Geueke, B., Riebel, B., Hummel, W. 2003. NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD. *Enzyme Microb. Technol.* 32, 205-211.

- Giacomini, D., Galletti, P., Quintavalla, A., Gucciardo, G., Paradisi, F. 2007. Highly efficient asymmetric reduction of arylpropionic aldehydes by horse liver alcohol dehydrogenase through dynamic kinetic resolution. *Chem. Commun.*, 4038-4040.
- Godoy, C.A., de las Rivas, B., Grazú, V., Montes, T., Guisán, J.M., López-Gallego, F., 2011a. Glyoxyl-disulfide agarose: A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins. *Biomacromolecules*. 12, 1800-1809.
- Godoy, C.A., de las Rivas, B., Bezbradica, D., Bolivar, J.M., López-Gallego, F., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. 2011b. Reactivation of a thermostable lipase by solid phase unfolding/refolding: effect of cysteine residues on refolding efficiency. *Enzyme Microb. Technol.* 49, 388-394.
- Goldberg, M.E. 1991. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry (Mosc)*. 30, 2790-2797.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., Liese, A. 2007a. Biocatalytic ketone reduction—a powerful tool for the production of chiral alcohols—part I: processes with isolated enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 237-248.
- Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., Liese, A. 2007b. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: Whole-cell reductions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 249-255.
- Grazú, V., López-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., González, R., Hermoso, J.A., García, J.L., Mateo, C., Guisán, J.M. 2010. Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*. *Process Biochem.* 45, 390-398.
- Gupta, M.N. 1991. Thermostabilization of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 14, 1-11.
- Guisán, J., 1988. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 375-382.
- Guisan, J. M., Rodriguez, V., Rosell, C. M., Soler, G., Bastida, A., Blanco, R. M., Fernandez-Lafuente, R., Garcia-Junceda, E. 1997. Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules. *Methods in Biotechnology. Immobilization of enzymes and cells*, Vol 1. Humana Press, Inc. Totowa, NJ. 289–298.
- Hartmeier, W., 1985. Immobilized biocatalysts - from simple to complex systems. *Trends Biotechnol.* 3, 149-153.
- Hecht, H.J., Erdmann, H., Park, H.J., Sprinzl, M., Schmid, R.D. 1995. Crystal structure of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Nat. Struct. Biol.* 2, 1109-1114.
- Hekmat, D., Bauer, R., Neff, V. 2007. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* 42, 71-76.
- Hem, J.D. 1963. Chemical equilibria affecting the behavior of manganese in natural water International Association of Scientific Hydrology. Bulletin Vol. 8, Issue 3, 30-37.
- Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczek, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H.P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., Fritz, H.J., 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22, 547-553.
- Hentall, P.L., Flowers, N., Bugg, T.D.H. 2001. Enhanced acid stability of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) analogue. *Chem. Commun.*, 2098-2099.
- Höllrigl, V., Hollmann, F., Kleeb, A.C., Buehler, K., Schmid, A. 2008. TADH, the thermostable alcohol dehydrogenase from *Thermus* sp. ATN1: A versatile new biocatalyst for organic synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 263-273.
- Hritz, J., Žoldák, G., Sedlák, E. 2006. Cofactor assisted gating mechanism in the active site of NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Proteins*. 64, 465-476.
- Huisman, G.W., Liang, J., Krebber, A. 2010. Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 122-129.
- Hummel, W. 1997. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 58, 145-184.
- Hummel, W. 1999. Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: Recent developments. *Trends Biotechnol.* 17, 487-492.

- Iberer, G., Schwinn, H., Josić, D., Jungbauer, A., Buchacher, A. 2001. Improved performance of protein separation by continuous annular chromatography in the size-exclusion mode. *J. Chromatogr.* 921, 15-24.
- Illanes, A. 1999. Stability of biocatalysts. *Electron. J. Biotechnol.* 2, 15-30.
- Inoue, K., Makino, Y., Itoh, N. 2005a. Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: A promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3633-3641.
- Inoue, K., Makino, Y., Itoh, N. 2005b. Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). *Tetrahedron-Asymmetr.* 16, 2539-2549.
- Inouye, S. 1994. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Lett.* 347, 163-168.
- Iyer, P.V., Ananthanarayan, L. 2008. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43, 1019-1032.
- Jiang, R., Bommaris, A.S. 2004. Hydrogen peroxide-producing NADH oxidase (nox-1) from *Lactococcus lactis*. *Tetrahedron-Asymmetr.* 15, 2939-2944.
- Johnson, S.L., Smith, K.W. 1977. Nucleophile and borate reactivity with nicotinamide adenine dinucleotide and its analogues. *J. Org. Chem.* 42, 2580-2589.
- Jokerst, J.V., Chou, J., Camp, J.P., Wong, J., Lennart, A., Pollard, A.A., Floriano, P.N., Christodoulides, N., Simmons, G.W., Zhou, Y., Ali, M.F., McDevitt, J.T. 2011. Location of biomarkers and reagents within agarose beads of a programmable bio-nano-chip. *Small* 7, 613-624.
- Jungbauer, A., Kaar, W., Schlegl, R. 2004. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr. Opin. Biotech.* 15, 487-494.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnval, H., Persson, B. 2002. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur. J. Biochem.* 269, 4409-4417.
- Kaluzna, I.A., David Rozzell, J., Kambourakis, S. 2005. Ketoreductases: stereoselective catalysts for the facile synthesis of chiral alcohols. *Tetrahedron-Asymmetr.* 16, 3682-3689.
- Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol.* 11, 471-478.
- Keith, J.M., Larrow, J.F., Jacobsen, E.N. 2001. Practical Considerations in kinetic resolution reactions. *Adv. Synth. Catal.* 343, 5-26.
- Kengen, S.W.M., Van Der Oost, J., De Vos, W.M. 2003. Molecular characterization of H₂O₂-forming NADH oxidases from *Archaeoglobus fulgidus*. *Eur. J. Biochem.* 270, 2885-2894.
- Kennedy, J.F., Melo, E.H.M., Jumel, K. 1990. Immobilized enzymes and cells. *Chem. Eng. Prog.* 86, 81-89.
- Klibanov, A.M., 1979. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.* 93, 1-25.
- Klibanov, A.M. 1983. Approaches to enzyme stabilization. *Biochem. Soc. T.* 11, 19-20.
- Kniemeyer O, Heider J. 2001. (S)-1-phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch. Microbiol.* 176, 129-35.
- Krieger, E., Koraimann, G., Vriend, G., 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins.* 47, 393-402.
- Krieger, E., Darden, T., Nabuurs, S.B., Finkelstein, A., Vriend, G., 2004. Making optimal use of empirical energy functions: Force-field parameterization in crystal space. *Proteins.* 57, 678-683.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. 2004a. Biocatalytic oxidation of primary and secondary alcohols. *Adv. Synth. Catal.* 346, 125-142.
- Kroutil, W., Mang, H., Edegger, K., Faber, K. 2004b. Recent advances in the biocatalytic reduction of ketones and oxidation of sec-alcohols. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 120-126.
- Kumar, A., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. 2000. Polymer displacement/shielding in protein chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 741, 103-113.
- Kuper, J., Tuck, S.W., Roccatano, D., Wilmanns, M., Schwaneberg, U. 2007. Understanding a mechanism of organic cosolvent inactivation in heme monooxygenase P450 BM-3. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5786-5787.

- Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81-87.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamed, R.J., Zeikus, J.G. 1981. Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. *Biochem. J.* 195, 183-190.
- Lasa, I., Berenguer, J., 1993. Thermophilic enzymes and their biotechnological potential. *Microbiologia SEM* 9, 77-89.
- Leonida, M.D., 2001. Redox enzymes used in chiral syntheses coupled to coenzyme regeneration. *Curr. Med. Chem.* 8, 345-369.
- Leresche, J.E., Meyer, H.P., 2006. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org. Process Res. Dev.* 10, 572-580.
- Levy, S.B. 1992. Dihydroxyacetone-containing sunless or self-tanning lotions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27, 989-993.
- Li, M.H., Wu, J., Liu, X., Lin, J.P., Wei, D.Z., Chen, H. 2010. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.* 101, 8294-8299.
- Lippincott, J., Apostol, I. 1999. Carbamylation of cysteine: A potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. *Anal. Biochem.* 267, 57-64.
- Liu, W., Wang, P. 2007. Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnol. Adv.* 25, 369-384.
- Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Rock, M.K. 1961. The stability of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 236, 2756-2759.
- Lyddiatt, A. 2002. Process chromatography: Current constraints and future options for the adsorptive recovery of bioproducts. *Curr. Opin. Biotech.* 13, 95-103.
- Mack, M., Grill, S. 2006. Riboflavin analogs and inhibitors of riboflavin biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 265-275.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2000. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 98-105.
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejvi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2005. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 456-462.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., López-Gallego, F., Pessela, B.C.C., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M. 2006. Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 274-280.
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R. 2007a. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451-1463.
- Mateo, C., Grazu, V., Palomo, J.M., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 2007b. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature Protocols*, 2, 1022-1033.
- Mateo, C., Grazi, V., Pessela, B.C.C., Montes, T., Palomo, J.M., Torres, R., López-Gallego, F., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2007c. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1593-1601.
- Mateo, C., Bolivar, J.M., Godoy, C.A., Rocha-Martin, J., Pessela, B.C., Curiel, J.A., Muñoz, R., Guisan, J.M., Fernández-Lorente, G. 2010. Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports. *Biomacromolecules* 11, 3112-3117.
- Maurer, S.C., Schulze, H., Schmid, R.D., Urlacher, V. 2003. Immobilization of P450 BM-3 and an NADP⁺ cofactor recycling system: towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Adv. Synth. Catal.* 345, 802-810.
- Merkley, E.D., Daggett, V., Parson, W.W. 2012. A temperature-dependent conformational change of NADH oxidase from *Thermus thermophilus* HB8. *Proteins.* 80, 546-555.

- Mesentsev, A.V., Lamzin, V.S., Tishkov, V.I., Ustinnikova, T.B., Popov, V.O., 1997. Effect of pH on kinetic parameters of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Biochem. J.* 321, 475-480.
- Miyamoto, K., Fujimori, K., Hirano, J.I., Ohta, H., 2009. Microbial kinetic resolution of 2-substituted-1-propanol. *Biocatal. Biotransfor.* 27, 66-70.
- Monti, D., Ottolina, G., Carrea, G., Riva, S., 2011. Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. *Chem. Rev.* 111, 4111-4140.
- Mozhaev, V.V., Berezin, I.V., Martinek, K. 1987. Reactivation of immobilized enzymes. *Methods Enzymol.* 135, 586-596.
- Mukhopadhyay, A. 1997. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 56, 61-109.
- Muller, P. 1994. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* 66, 1077-1184.
- Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T. 2003. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts. *Tetrahedron-Asymmetr.* 14, 2659-2681.
- Nakamura, K., Matsuda, T., 2006. Biocatalytic reduction of carbonyl groups. *Curr. Org. Chem.* 10, 1217-1246.
- Nestl, B.M., Nebel, B.A., Hauer, B., 2011. Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 187-193.
- Neuhoﬀ, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9, 255-262.
- Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D. 2003. The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J. Mol. Biol.* 327, 317-328.
- Noyori, R., 2002. Asymmetric catalysis: Science and opportunities (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Edit.* 41, 2008-2022.
- Okamoto, S., Yu, F., Harada, H., Okajima, T., Hattan, J.I., Misawa, N., Utsumi, R. 2011. A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. *FEBS J.* 278, 2892-2900.
- Oppenheimer, N.J., Kaplan, N.O., 1974. Structure of the primary acid rearrangement product of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). *Biochemistry (Mosc).* 13, 4675-4685.
- Pace, V., Cabrera, A.C., Ferrario, V., Sinisterra, J.V., Ebert, C., Gardossi, L., Braiuca, P., Alcántara, A.R. 2011. Structural bases for understanding the stereoselectivity in ketone reductions with ADH from *Thermus thermophilus*: a quantitative model. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 70, 23-31.
- Pagliaro, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., Della Pina, C. 2007. From glycerol to value-added products. *Angew. Chem. Int. Edit.* 46, 4434-4440.
- Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. 2004. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Curr. Opin. Biotech.* 15(4), 272-279.
- Pantini, G., Ingoglia, R., Brunetta, F., Brunetta, A. 2007. Sunless tanning products containing dihydroxyacetone in combination with a perfluoropolyether phosphate. *Inter. J. Cosmetic. Sci.* 29, 201-209.
- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A., Kyriakidis, D.A., 2002. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 1-12.
- Park, H.J., Reiser, C.O.A., Kondruweit, S., Erdmann, H., Schmid, R.D., Sprinzl, M. 1992. Purification and characterization of a NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Eur. J. Biochem.* 205, 881-885.
- Park, H.J., Erdmann, H., Sprinzl, M. 1995. NADH oxidase of *Thermus thermophilus* HB8 overproduced from *Escherichia coli*. *Protoplasma.* 184, 104-110.
- Patel, R.N., 2006. Biocatalysis: Synthesis of chiral intermediates for drugs. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 9, 741-764.
- Patel, R.N., 2008. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* 252, 659-701.
- Pedroche, J., del Mar Yust, M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M., Millán, F., 2007. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1160-1166.

- Pennacchio, A., Pucci, B., Secundo, F., La Cara, F., Rossi, M., Raia, C.A. 2008. Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-chain NAD(H)-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3949-3958.
- Pennacchio, A., Giordano, A., Pucci, B., Rossi, M., Raia, C.A. 2010a. Biochemical characterization of a recombinant short-chain NAD(H)-dependent dehydrogenase/reductase from *Sulfolobus acidocaldarius*. Extremophiles 14, 193-204.
- Pennacchio, A., Giordano, A., Esposito, L., Langella, E., Rossi, M., Raia, C.A. 2010b. Insight into the stereospecificity of short-chain *Thermus thermophilus* alcohol dehydrogenase showing pro-S hydride transfer and Prelog enantioselectivity. Protein and Peptide Letters 17, 437-443.
- Pessela, B.C.C., Fernández-Lafuente, R., Fuentes, M., Vián, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Mateo, C., Guisán, J.M. 2003. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. Enzyme Microb. Technol. 32, 369-374.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. J. Comput. Chem. 25, 1605-12.
- Pilipenko, O.S., Atyaksheva, L.F., Poltorak, O.M., Chukhray, E.S. 2007. Dissociation and catalytic activity of oligomer forms of β -galactosidases. Russ. J. Phys. Chem. A. 81, 990-994.
- Poltorak, O.M., Chukhray, E.S., Torshin, I.Y. 1998. Dissociative thermal inactivation, stability, and activity of oligomeric enzymes. Biochemistry (Moscow) 63, 303-311.
- Popov, V.O., Lamzin, V.S. 1994. NAD^+ -dependent formate dehydrogenase. Biochem. J. 301, 625-643.
- Porath, J., Carlsson, J.A.N., Olsson, I., Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature. 258, 598-599.
- Porath, J. 1992. Immobilized metal ion affinity chromatography. Protein Expres. Purif. 3, 263-281.
- Radianingtyas, H., Wright, P.C. 2003. Alcohol dehydrogenases from thermophilic and hyperthermophilic archaea and bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 27, 593-616.
- Radoi, A., Compagnone, D., Devic, E., Palleschi, G. 2007. Low potential detection of NADH with Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes and recombinant NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. Sensor Actuat. B-Chem. 121, 501-506.
- Raghava, S., Gupta, M.N. 2010. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase with an unusual specificity towards glycerol from *Thermus thermophilus*. Bioresour. Technol. 101, 2554-2557.
- Rao, C.S., 2001. Purification of large proteins using ion-exchange membranes. Process Biochem. 37, 247-256.
- Rehder, V., Jaenicke, R. 1992. Stability and reconstitution of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*. J. Biol. Chem. 267, 10999-11006.
- Ricca, E., Brucher, B., Schrittwieser, J.H., 2011. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. Adv. Synth. Catal. 353, 2239-2262.
- Riebel, B.R., Gibbs, P.R., Wellborn, W.B., Bommarius, A.S. 2002. Cofactor regeneration of NAD^+ from NADH: novel water-forming NADH oxidases. Adv. Synth. Catal. 344, 1156-1168.
- Riebel, B.R., Gibbs, P.R., Wellborn, W.B., Bommarius, A.S., 2003. Cofactor regeneration of both NAD^+ from NADH and NADP^+ from NADPH:NADH oxidase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. Adv. Synth. Catal. 345, 707-712.
- Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T., Hummel, W. 2009. Characterisation of a recombinant NADP-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and its application in the production of L-glyceraldehyde. ChemBioChem. 10, 1888-1896.
- Rocha-Martin, J., Vega, D.E., Cabrera, Z., Bolivar, J.M., Fernandez-Lafuente, R., Berenguer, J., Guisan, J.M., 2009. Purification, immobilization and stabilization of a highly enantioselective alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 cloned in *E. coli*. Process Biochem. 44, 1004-1012.
- Rocha-Martin, J., Vega, D., Bolivar, J., Godoy, C., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisan, J., Lopez Gallego, F., 2011. New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD^+ -recycling enzyme. BMC Biotechnol. 11, 101.

- Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolivar, J.M., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisán, J.M., López-Gallego, F., 2012. Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds. *Bioresour. Technol.* 103, 343-350.
- Rodrigues, R.C., Bolivar, J.M., Palau-Ors, A., Volpato, G., Ayub, M.A.Z., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009a. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 44, 386-393.
- Rodrigues, R.C., Godoy, C.A., Filice, M., Bolivar, J.M., Palau-Ors, A., Garcia-Vargas, J.M., Romero, O., Wilson, L., Ayub, M.A.Z., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009b. Reactivation of covalently immobilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochem.* 44, 641-646.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I., 1998. Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* 432, 21-26.
- Romero, O., Vergara, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., Illanes, A., Wilson, L. 2009. Simple strategy of reactivation of a partially inactivated penicillin G acylase biocatalyst in organic solvent and its impact on the synthesis of β -lactam antibiotics. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 472-479.
- Rosevear, A., 1984. Immobilized biocatalysts: a critical review. *Journal of chemical technology and biotechnology. Biotechnology* 34 B, 127-150.
- Royer, G.P., 1980. Immobilized enzymes catalysis reviews. 1978. *Catal. Rev. Eng.* 22, 29-73.
- Rozzell, J.D. 1999. Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorgan. Med. Chem.* 7, 2253-2261.
- Sadana, A., Henley, J.P. 1987. Deactivation-disguised kinetics. *J. Biotechnol.* 5, 67-76.
- Sambrook J., Fariqz E. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sasaki, S. I., Hashizume, A., Citterio, D., Fujii, E., Suzuki, K. 2002. Trifluoroacetophenone derivatives as amino acid selective ionophores for the potentiometric determination of phenylalanine. *Angew. Chem. Int. Edit.* 41, 3005-3007.
- Satoshi, I. 1994. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Lett.* 347, 163-168.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J.B., Bühler, B. 2002. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotech.* 13, 359-366.
- Serban, S., El Murr, N., 2006. Redox-flexible NADH oxidase biosensor: A platform for various dehydrogenase bioassays and biosensors. *Electrochim. Acta.* 51, 5143-5149.
- Sheldon, R.A., 1997. Catalysis: The key to waste minimization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 381-388.
- Sheldon, R.A., 2007a. The e Factor: Fifteen years on. *Green Chemistry* 9, 1273-1283.
- Sheldon, R.A., 2007b. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1289-1307.
- Shibata, N., Mizuta, S., Kawai, H. 2008. Recent advances in enantioselective trifluoromethylation reactions. *Tetrahedron-Asymmetr.* 19, 2633-2644.
- Singh, R.P., Shreeve, J.M. 2000. Nucleophilic trifluoromethylation reactions of organic compounds with (trifluoromethyl)trimethylsilane. *Tetrahedron.* 56, 7613-7632.
- Singh, S.M., Panda, A.K. 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 303-310.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Soler, G., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M. 1997. Reactivation strategies by unfolding/refolding of chymotrypsin derivatives after inactivation by organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1339, 167-175.
- Sorgedrager, M.J., Van Rantwijk, F., Huisman, G.W., Sheldon, R.A. 2008. Asymmetric carbonyl reductions with microbial ketoreductases. *Adv. Synth. Catal.* 350, 2322-2328.
- Spencer, P., Bown, K.J., Scawen, M.D., Atkinson, T., Gore, M.G. 1989. Isolation and characterisation of the glycerol dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *BBA-Protein Struct. M.* 994, 270-279.

- Srere, P.A., Uyeda, K. 1976. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. 11-19. *Methods Enzymol.* 1976 44:11-19.
- Stothard, P., Van Domselaar, G., Shrivastava, S., Guo, A., O'Neill, B., Cruz, J., Ellison, M., Wishart, D.S. 2005. BacMap: an interactive picture atlas of annotated bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 33, 317-320.
- Straathof, A.J.J., Panke, S., Schmid, A. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotech.* 13, 548-556.
- Strickland, J.E., Miller, O.N. 1968. Inhibition of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by dihydroxyacetone, high ionic strength, and monovalent cations. *BBA-Protein Struct. M.* 159, 221-226.
- Suan, C., Sarmidi, M.R. 2004. Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 28, 111-119.
- Suga, Y., Ikejima, A., Matsuba, S., Ogawa, H. 2002. Medical pearl: DHA application for camouflaging segmental vitiligo and piebald lesions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47, 436-438.
- Sukyai, P., Rezić, T., Lorenz, C., Mueangtoom, K., Lorenz, W., Haltrich, D., Ludwig, R. 2008. Comparing soluble and co-immobilized catalysts for 2-ketoaldose production by pyranose 2-oxidase and auxiliary enzymes. *J. Biotechnol.* 135, 281-290.
- Sun, Q., Jiang, Y., Jiang, Z., Zhang, L., Sun, X., Li, J. 2009. Green and efficient conversion of CO₂ to methanol by biomimetic coimmobilization of three dehydrogenases in protamine-templated titania. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 4210-4215.
- Tanner, J.J., Lei, B., Tu, S.C., Krause, K.L. 1996. Flavin reductase P: Structure of a dimeric enzyme that reduces flavin. *Biochemistry (Mosc).* 35, 13531-13539.
- Thomas, S.M., DiCosimo, R., Nagarajan, V. 2002. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* 20, 238-242.
- Tishkov, V.I., Popov, V.O. 2004. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase. *Biochemistry (Moscow)* 69, 1252-1267.
- Tishkov, V.I., Popov, V.O., 2006. Protein engineering of formate dehydrogenase. *Biomol. Eng.* 23, 89-110.
- Tao, J., Lin, G.-Q., Liese, A. 2009. Biocatalysis for the pharmaceutical industry: discovery, development, and manufacturing. Wiley, J., Eds. John Wiley and Sons. Chichester, UK.
- Toomey, D., Mayhew, S.G. 1998. Purification and characterisation of NADH oxidase from *Thermus aquaticus* YT-1 and evidence that it functions in a peroxide-reduction system. *Eur. J. Biochem.* 251, 935-945.
- Torres-Salas, P., Del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A.O., Plou, F.J. 2011. Immobilized biocatalysts: Novel approaches and tools for binding enzymes to supports. *Adv. Mater.* 23, 5275-5282.
- Torres, R., Pessela, B.C.C., Mateo, C., Ortiz, C., Fuentes, M., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2004. Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnol. Progr.* 20, 1297-1300.
- Torres, R., Pessela, B.C.C., Fuentes, M., Mateo, C., Munilla, R., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., 2006. Supports coated with PEI as a new tool in chromatography. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 711-716.
- Tung, J.S., Knight, C.A. 1972. Relative importance of some factors affecting the electrophoretic migration of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 48, 153-163.
- Turner, P., Mamo, G., Karlsson, E.N., 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6, 9-32.
- Van Der Donk, W.A., Zhao, H., 2003. Recent developments in pyridine nucleotide regeneration. *Curr. Opin. Biotech.* 14, 421-426.
- Vazquez-Figueroa, E., Yeh, V., Broering, J.M., Chaparro-Riggers, J.F., Bommarius, A.S. 2008. Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media. *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 673-680.
- Vunnum, S., Gallant, S.R., Kim, Y.J., Cramer, S.M. 1995. Immobilized metal affinity chromatography: modeling of nonlinear multicomponent equilibrium. *Chem. Eng. Sci.* 50, 1785-1803.
- Wandrey, C. 2004. Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chem Rec* 4, 254-265.

- Wang, C., Wang, L., Geng, X. 2009. Optimization of refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Escherichia coli* by immobilized metal ion affinity chromatography. *Biochem. Eng. J.* 43, 197-202.
- Weckbecker, A., Hummel, W. 2006. Cloning, expression, and characterization of an (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatal. Biotransfor.* 24, 380-389.
- Weckbecker, A., Gröger, H., Hummel, W. 2010. Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 120, 195-242.
- Wedler, F.C., Hoffmann, F.M. 1974. Glutamine synthetase of *Bacillus stearothermophilus*. I. Purification and basic properties. *Biochemistry (Mosc.)* 13, 3207-3214.
- Wenda, S., Illner, S., Mell, A., Kragl, U., 2011. Industrial biotechnology - The future of green chemistry? *Green Chemistry* 13, 3007-3047.
- Wichmann, R., Vasic-Racki, D. 2005. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Cofactor regeneration at the lab scale. 92, 225-260.
- Wohlgemuth, R. 2010a. Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 713-724.
- Wohlgemuth, R. 2010b. Asymmetric biocatalysis with microbial enzymes and cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 283-292.
- Wong, C.H., Whitesides, G.M. 1981. Enzyme-catalyzed organic synthesis: NAD(P)H cofactor regeneration by using glucose 6-phosphate and the glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 4890-4899.
- Wood, A.N.P., Fernandez-Lafuente, R., Cowan, D.A. 1995. Purification and partial characterization of a novel thermophilic carboxylesterase with high mesophilic specific activity. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 816-825.
- Woodley, J.M. 2008. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* 26, 321-327.
- Wu, X., Kobori, H., Orita, I., Zhang, C., Imanaka, T., Xing, X.H., Fukui, T. 2012. Application of a novel thermostable NAD(P)H oxidase from hyperthermophilic archaeon for the regeneration of both NAD⁺ and NADP⁺. *Biotechnol. Bioeng.* 109, 53-62.
- Yamada H., Nagao A., Nishise H., Tani Y. 1982. Glycerol dehydrogenase from *Cellulomonas* sp. NT3060: Purification and characterization. *Agric. Biol. Chem.* 46, 2333-2339.
- Yang, L., Dordick, J.S., Garde, S. 2004. Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. *Biophys. J.* 87, 812-821.
- Yung Chi, C., Prusoff, W.H. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- Yusdy, Patel, S.R., Yap, M.G.S., Wang, D.I.C. 2009. Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem. Eng. J.* 48, 13-21.
- Zhang, Y., Gao, F., Zhang, S.P., Su, Z.G., Ma, G.H., Wang, P. 2011. Simultaneous production of 1,3-dihydroxyacetone and xylitol from glycerol and xylose using a nanoparticle-supported multi-enzyme system with in situ cofactor regeneration. *Bioresour. Technol.* 102, 1837-1843.
- Zhao, H., van der Donk, W.A. 2003. Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Curr. Opin. Biotech.* 14, 583-589.
- Zheng, Y., Chen, X., Shen, Y., 2008. Commodity chemicals derived from glycerol, an important biorefinery feedstock. *Chem. Rev.* 108, 5253-5277.
- Zheng, M., Zhang, S. 2011. Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1,3-dihydroxyacetone. *Biocatalysis Biotransformation* 29, 278-287.
- Zhi, W., Landry, S.J., Gierasch, L.M., Srere, P.A. 1992. Renaturation of citrate synthase: Influence of denaturant and folding assistants. *Protein Sci.* 1, 522-529.
- Zhou, C.H., Beltramini, J.N., Fan, Y.X., Lu, G.Q. 2008. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chem. Soc. Rev.* 37, 527-549.

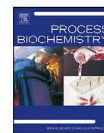


Anexos



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

Purification, immobilization and stabilization of a highly enantioselective alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 cloned in *E. coli*

Javier Rocha-Martin^{a,1}, Daniel E. Vega^{b,1}, Zaida Cabrera^a, Juan M. Bolivar^a,
Roberto Fernandez-Lafuente^{a,*}, Jose Berenguer^{b,*}, Jose M. Guisan^{a,*}

^aDepartamento de Biotecnología, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^bCentro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2008

Received in revised form 29 April 2009

Accepted 29 April 2009

Keywords:

Dehydrogenases
Thermophilic enzymes
Reversible immobilization
Phenyl ethanol
PEI-coated supports
Asymmetric reductions

ABSTRACT

This paper shows the purification and immobilization of a very interesting thermophilic alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 cloned in *Escherichia coli*. The purification was based on a first thermal treatment of the crude extract, that leaves the target enzyme in the supernatant, followed by the adsorption of most contaminant proteins in a IMAC column (the target protein did not adsorb on these columns due to the poorness of His residues). Final purification factor was around a 9-fold factor (no other protein bands were detected in SDS-PAGE gels) with an overall yield around 80%. Covalent immobilization of the enzyme on very different supports only permitted to improve the enzyme stability by a 5–10-fold factor, very similarly to the results obtained by the adsorption of the enzyme on polyethyleneimine coated supports. This enzyme adsorbed by ionic exchange maintained the activity unaltered during immobilization which was a very rapid process, and was more stable than the covalent preparations in the presence of organic solvents, and the enzyme was quite strongly adsorbed on the support. Therefore, it was proposed as a good option to prepare industrial biocatalysts of the enzyme. This preparation was utilized in the asymmetric reduction of acetophenone to produce (S)-1-phenylethanol, with an enantiomeric excess of more than 99%.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dehydrogenases are among the most interesting enzymes in biocatalysis. The asymmetric reductions of ketones [1–8] or double bonds [9] are examples of these interesting reactions. Stereoselective reduction of ketones to form chiral alcohols is one of the most useful reactions in organic synthesis [10–12]. Chiral alcohols are precursors of many high value compounds (e.g., pharmaceuticals) and dehydrogenases are a very good alternative to catalyze the asymmetric ketone reduction processes. The interest in these enzymes has reinforced the search of new dehydrogenases and has increased the number of available ones [13–17]. On the other hand, cost-effective methods for recycling of the nicotinamide cofactors have been developed [18–21]. Reactions using alcohol dehydrogenases typically are environmentally friendly and frequently give high yields and optical purities (>99%) [22–25]. Thus, enzymatic

reductions of ketones are expanding the possibilities of stereoselective chemical reductions.

However, as in many enzymatic processes, one of the problems for their industrial implementation is the limited stability of most available dehydrogenases [26].

The use of enzymes from thermophilic microorganisms may be a solution for this stability problem. These enzymes have a higher thermostability, in some instances correlated to a higher stability in the presence of organic solvents [27–30].

In fact, several dehydrogenases from thermophilic sources have been recently described [31–33]. The genus *Thermus* is one of the most widely distributed bacterial thermophiles, with isolates found all over the world in both natural and artificial thermophilic environments [34]. Among these isolates, the strains *Thermus thermophilus* HB27 and HB8 are the most studied ones [35,36], with their respective sequences already published (<http://www.thermus.org> and [37]).

Very recently, an alcohol dehydrogenase from *T. thermophilus* HB27 encoded by the gene TTC0002 has been purified and partially characterized and called TtADH [38]. This very interesting enzyme belongs to the short-chain dehydrogenases/reductase (SDRs) superfamily. The enzyme was very thermophilic and thermo-resistant, the optimal temperature was 73 °C and the half-life at

* Corresponding authors.

E-mail addresses: rlf@icp.csic.es (R. Fernandez-Lafuente),

jberenguer@cbm.uam.es (J. Berenguer), jnguisan@icp.csic.es (J.M. Guisan).

¹ Both authors have equally contributed to this paper.

Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports

Cesar Mateo,[†] Juan Manuel Bolivar,[†] Cesar A. Godoy,[†] Javier Rocha-Martin,[†] Benevides C. Pessela,[‡] Jose Antonio Curiel,[‡] Rosario Muñoz,[‡] Jose M. Guisan,^{*,†} and Gloria Fernández-Lorente^{*,‡}

Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, and Departamento de Microbiología, Instituto de Fermentaciones Industriales-CSIC, C/Juan de la Cierva 3, 2006 CSIC, Madrid, Spain

Received August 6, 2010; Revised Manuscript Received September 9, 2010

Novel heterofunctional glyoxyl-agarose supports were prepared. These supports contain a high concentration of groups (such as quaternary ammonium groups, carboxyl groups, and metal chelates) that are capable of adsorbing proteins, physically or chemically, at neutral pH as well as a high concentration of glyoxyl groups that are unable to immobilize covalently proteins at neutral pH. By using these supports, a two-step immobilization protocol was developed. In the first step, enzymes were adsorbed at pH 7.0 through adsorption of surface regions, which are complementary to the adsorbing groups on the support, and in the second step, the immobilized derivatives were incubated under alkaline conditions to promote an intramolecular multipoint covalent attachment between the glyoxyl groups on the support and the amino groups on the enzyme surface. These new derivatives were compared with those obtained on a monofunctional glyoxyl support at pH 10, in which the region with the greatest number of lysine residues participates in the first immobilization step. In some cases, multipoint immobilization on heterofunctional supports was much more efficient than what was achieved on the monofunctional support. For example, derivatives of tannase from *Lactobacillus plantarum* on an amino-glyoxyl heterofunctional support were 20-fold more stable than the best derivative on a monofunctional glyoxyl support. Derivatives of lipase from *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) on the amino-glyoxyl supports were two times more active and four times more enantioselective than the corresponding monofunctional glyoxyl support derivative.

Introduction

The development of simple protocols for the immobilization and stabilization of enzymes is an exciting goal in the field of enzyme biotechnology.^{1–6} Immobilization of enzymes by multipoint covalent attachment is one of the most interesting approaches to immobilize and stabilize enzymes simultaneously.^{3,4,6–10} An enzyme molecule that is attached to a rigid support through many covalent linkages via short spacer arms should be highly stabilized. The residues that are involved in the covalent immobilization of the enzyme should maintain their relative positions when conformational changes are caused by different distorting agents, such as heat and organic solvents. Therefore, the intensity of the conformational changes caused by these agents should be strongly attenuated.^{8,11–13}

Immobilization of enzymes on highly activated glyoxyl supports under alkaline conditions promotes an orientation on the support surface, in which the enzyme becomes immobilized through its surface region or regions containing the greatest number of lysine residues. This favorable orientation results in an intense multipoint covalent immobilization.^{14,15} In addition to promote this enzyme orientation, glyoxyl groups have many other properties that result in an intense multipoint covalent immobilization. They are stable under alkaline conditions, they are reactive toward unprotonated primary amines, and they do

not exhibit steric hindrances for intramolecular reactions.¹⁶ In fact, many industrial enzymes have been stabilized by multipoint covalent attachment on glyoxyl-agarose gels.^{9,15}

It would also be interesting to design new immobilization protocols in which multipoint covalent immobilization proceeds through regions of the enzyme that are more sensitive to denaturing agents. For example, these regions could encompass unstable loops, domains close to the active center, and hydrophobic pockets. Therefore, their rigidification could result in more stable catalysts even when the number of covalent linkages is lower than that obtained by multipoint attachment through the region having the highest amount of lysine residues. In addition to stabilization, rigidification of the enzyme through these key regions could also promote a higher recovery of activity after immobilization and an improved selectivity of the immobilized enzymes that are intended for the modification of non-natural substrates.

Multipoint covalent attachment of enzymes on novel heterofunctional glyoxyl-agarose supports is proposed here. The preparation of these heterofunctional supports is here described (Scheme 1). The novel supports contain a high concentration of groups that are able to adsorb proteins at neutral pH as well as a high concentration of glyoxyl groups that are unable to covalently immobilize the enzyme at neutral pH. The glyoxyl groups are much more reactive than the traditionally used epoxy groups. By using these supports, we developed a two-step immobilization protocol. In the first step, enzymes were adsorbed at neutral pH through surface regions that are complementary to the adsorbing groups on the supports, and in the second step, the adsorbed derivatives were incubated under

* To whom correspondence should be addressed. (J.M.G.) E-mail: jmguisan@icp.csic.es. Fax: +34 915854760. Tel: +34 915854809. (G.F.L.) E-mail: gflorente@ifii.csic.es. Fax: +34 915644853. Tel: +34 915622900.

[†] Instituto de Catálisis-CSIC.

[‡] Instituto de Fermentaciones Industriales-CSIC.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD⁺-recycling enzyme

Javier Rocha-Martín¹, Daniel Vega², Juan M. Bolívar¹, Cesar A. Godoy¹, Aurelio Hidalgo², José Berenguer², José M. Guisán^{1*} and Fernando López-Gallego^{1*}

Abstract

Background: The number of biotransformations that use nicotinamide recycling systems is exponentially growing. For this reason one of the current challenges in biocatalysis is to develop and optimize more simple and efficient cofactor recycling systems. One promising approach to regenerate NAD⁺ pools is the use of NADH-oxidases that reduce oxygen to hydrogen peroxide while oxidizing NADH to NAD⁺. This class of enzymes may be applied to asymmetric reduction of prochiral substrates in order to obtain enantiopure compounds.

Results: The NADH-oxidase (NOX) presented here is a flavoenzyme which needs exogenous FAD or FMN to reach its maximum velocity. Interestingly, this enzyme is 6-fold hyperactivated by incubation at high temperatures (80°C) under limiting concentrations of flavin cofactor, a change that remains stable even at low temperatures (37°C). The hyperactivated form presented a high specific activity (37.5 U/mg) at low temperatures despite isolation from a thermophile source. Immobilization of NOX onto agarose activated with glyoxyl groups yielded the most stable enzyme preparation (6-fold more stable than the hyperactivated soluble enzyme). The immobilized derivative was able to be reactivated under physiological conditions after inactivation by high solvent concentrations. The inactivation/reactivation cycle could be repeated at least three times, recovering full NOX activity in all cases after the reactivation step. This immobilized catalyst is presented as a recycling partner for a thermophile alcohol dehydrogenase in order to perform the kinetic resolution secondary alcohols.

Conclusion: We have designed, developed and characterized a heterogeneous and robust biocatalyst which has been used as recycling partner in the kinetic resolution of *rac*-1-phenylethanol. The high stability along with its capability to be reactivated makes this biocatalyst highly re-useable for cofactor recycling in redox biotransformations.

Keywords: NAD⁺, extremophiles, dehydrogenase, immobilization

Background

Dehydrogenases catalyze a great variety of redox reactions in fine chemistry (asymmetric reduction of prochiral acetones, selective oxidations of polyols....) [1-5]. However, since they require nicotinamide cofactors to catalyze substrate reduction or oxidation, their biotechnological implementation must address the issues of cofactor stability and thermodynamic equilibria that

otherwise prevent quantitative substrate conversion [6-9]. Cofactor recycling *via* electrochemical, photochemical or enzymatic methods is one alternative to overcome these issues [10]. Enzyme-mediated cofactor recycling is one of the most promising approaches to address redox reaction limitations, enabling quantitative substrate conversions [10,11]. The number of biotransformations that uses nicotinamide recycling systems is exponentially growing. For this reason one of the current challenges in biocatalysis is to develop and optimize more simple and efficient cofactor recycling systems [6-9,12].

* Correspondence: jmguisan@icp.csic.es; flopez@icp.csic.es

¹Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Rocha-Martín et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Characterization and further stabilization of a new anti-prelog specific alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 for asymmetric reduction of carbonyl compounds

Javier Rocha-Martín^a, Daniel Vega^b, Juan M. Bolívar^a, Aurelio Hidalgo^b, José Berenguer^b, José M. Guisán^{a,*}, Fernando López-Gallego^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Departamento de Biología Molecular, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2011
Received in revised form 4 October 2011
Accepted 6 October 2011
Available online 17 October 2011

Keywords:

Enzyme immobilization
Stabilization of multimeric enzymes
Multipoint covalent attachment
Profen derivatives
Aryl ketones

ABSTRACT

The use of dehydrogenases in asymmetric chemistry has exponentially grown in the last decades facilitated by the genome mining. Here, a new short-chain alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 has been expressed, purified, characterized and stabilized by immobilization on solid supports. The enzyme catalyzes both oxidative and reductive reactions at neutral pH with a broad range of substrates. Its highest activity was found towards the reduction of 2,2',2''-trifluoroacetophenone (85 U/mg at 65 °C and pH 7). Moreover, the enzyme was stabilized more than 200-fold by multipoint covalent immobilization on agarose matrixes via glyoxyl chemistry. Such heterogeneous catalyst coupled to an immobilized cofactor recycling partner performed the quantitative asymmetric reduction of 2,2',2''-trifluoroacetophenone and *rac*-2-phenylpropanal to (*S*)-(+)- α -(trifluoromethyl)benzyl alcohol and (*R*)-2-phenyl-1-propanol with enantiomeric excesses of 96% and 71%, respectively. To our knowledge this is the first alcohol dehydrogenase from a thermophilic source with anti-Prelog selectivity for aryl ketones and that preferentially produces *R*-profens.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In modern chemistry, alcohol dehydrogenases (ADH) have taken an important role because of their versatility in redox reactions. They can perform both oxidation and reductions extending from kinetics resolutions to asymmetric reductions. Their frequent exquisite enantioselectivity makes them excellent catalyst in the pharmaceutical industry because they facilitate the synthesis of high valuable enantiopure drugs under “green” conditions (Kroutil et al., 2004). This context has encouraged the screening of organisms and metagenomes in the search of oxidoreductases with low substrate specificity but maintaining high regio- and enantio-selectivity, high catalytic efficiency and high stability. Thermophilic sources have been extensively exploited to obtain new highly stable ADHs (Höllrigel et al., 2008; Pennacchio et al., 2008;

Raghava and Gupta, 2010). Among the discovered enzymes, the most representative examples are ADH from *Bacillus stearothermophilus* (BsADH), *Sulfolobus solfataricus* (SsADH) and *Thermus thermophilus* HB27 (Tt27-ADH1). The latter one has been described as a highly selective short-chain NADH-dependent alcohol dehydrogenase (Pennacchio et al., 2008). This enzyme is able to oxidize selectively pro-chiral ketones such as 2,2',2''-trifluoroacetophenone and acetophenone (Pennacchio et al., 2008; Rocha-Martín et al., 2009). The activity toward the former substrate was much higher than towards the latter one, however quantitative oxidation of acetophenone to (*S*)-1-phenylethanol was achieved using an immobilized T27t-ADH1 catalyst coupled to a NADH-recycling system formed by an immobilized derivative of formate dehydrogenase (FDH) from *Pseudomonas* sp. (Rocha-Martín et al., 2009).

In this context, many redox biotransformations are performed using immobilized systems (Liu et al., 2009; Tong et al., 2011). The immobilization itself would endow simplicity to the system since it enables the easy separation and reusability of the biocatalyst. However, immobilization may affect the enzyme properties such as activity, stability, or selectivity (Sheldon, 2007). Hence, the immobilization protocol that better fits to the bio-process requirements should be chosen. For many enzymes, multipoint covalent attachment on porous supports has been revealed as an

Abbreviations: TFA, 2,2',2''-trifluoroacetophenone; Tt27-ADH2, alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 described in this study; Tt27-ADH1, alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB27 described by (Pennacchio et al., 2008); Ag-G, agarose matrix activated with glyoxyl groups.

* Corresponding authors. Tel.: +34 915854809; fax: +34 915854760 (J.M. Guisán), tel.: +34 915854777; fax: +34 915854760 (F. López-Gallego).

E-mail addresses: jmguisan@icp.csic.es (J.M. Guisán), flopez@icp.csic.es (F. López-Gallego).

0960-8524/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biortech.2011.10.018

Rational co-immobilization of bi-enzyme systems on porous supports applied to bio-redox reactions with in situ recycling of soluble cofactor

Javier Rocha-Martín^a, Blanca de las Rivas^b, Rosario Muñoz^b, José M. Guisán^{a*} and Fernando López-Gallego^{a*}

^a Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

^b Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, CSIC, 28006 Madrid, Spain

Supporting information for this article is available on the WWW under

Abstract. The immobilized bi-enzymatic systems for redox reactions are formed by two dehydrogenases; one catalyzing the main reaction and the other acting as cofactor recycling partner. They may be separately immobilized onto two different carriers (**biocatalyst 2-2**) or co-immobilized onto the same carrier (**biocatalyst 2-1**). In the former strategy the reduced or oxidized cofactor must diffuse from one porous carrier to the other and *viceversa*. Conversely, in the latter one the cofactor is recycled *in situ* inside the same porous particle, at the vicinity of the main dehydrogenase. In principle, a system where both enzymes are co-immobilized seems to be more favorable for efficiently regenerating the cofactor pool in its right oxidation state. Nevertheless, the co-immobilization itself does not guarantee the success of the bi-enzyme system. Herein, we have developed tailor-made co-immobilization protocols to assemble three different *in vitro* bioredox systems (two selective reductions and one selective oxidation).

Each system is formed by one main and selective dehydrogenase and one recycling dehydrogenase that uses cheap electron donor or acceptors to regenerate the corresponding cofactor. In all cases, the optimal co-immobilization protocol leads the system to more efficient performances than systems where the two dehydrogenases are immobilized on two different carriers. For one specific case (one thermophilic system), NADH is recycled 4600 times using 50 µeq of cofactor per equivalent of substrate at 55 °C. Moreover, it has been found that uniform distribution of both dehydrogenases across the porous surface enhances the cofactor recycling by 1.5-fold factor, likely because of vicinal cooperation effects. Hence, this rational methodology for co-immobilizing bi-enzymatic systems may be extended to other biocatalytic cascades, opening a window for the optimization of others multi-enzyme biotransformations where cofactor recycling is needed.

Keywords: Alcohol dehydrogenase; NAD(H); glycerol dehydrogenase; NADH oxidase; glutamate dehydrogenase; protein immobilization; multi-enzyme cascades.

Abbreviations: **Biocatalyst 2-2**: main and recycling dehydrogenases separately immobilized onto two different carriers. **Biocatalyst 2-1**: main and recycling dehydrogenases co-immobilized onto the same carrier. **System A**: NADPH recycling system applied to the asymmetric reduction of 2-phenylpropionaldehyde to preferentially yield (S)-2-phenyl-1-propanol. **System B**: NAD⁺ recycling system applied to the selective oxidation of glycerol that yields dihydroxyacetone. **System C**: NADH recycling system applied to the asymmetric bioreduction of 2,2,2-trifluoroacetophenone to yield (R)-α-(trifluoromethyl)benzyl alcohol. **mainDH**: main dehydrogenase. **recDH**: recycling dehydrogenase. **Gox**: glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxidans*. **Ps-FDH**: formate dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. **Cl-GyDH**: glycerol dehydrogenase from *Citrobacter braakii*. **T12Z-NOX**: NADH oxidase from *Thermus thermophilus* HB27. **T12Z-ADH2**: alcohol dehydrogenase

Otras publicaciones relacionadas con la Tesis:

Bolivar, J.M., Cava, F., Mateo, C., **Rocha-Martín, J.**, Guisan, J.M., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R., 2008. Immobilization-stabilization of a new recombinant glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80, 49-58.

Bolivar, J.M., Mateo, C., **Rocha-Martín, J.**, Cava, F., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009. The adsorption of multimeric enzymes on very lowly activated supports involves more enzyme subunits: stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* by immobilization on heterofunctional supports. Enzyme Microb. Technol. 44, 139-144.

Bolivar, J.M., **Rocha-Martín, J.**, Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009. Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. Biomacromolecules 10, 742-747.

Bolivar, J.M., **Rocha-Martín, J.**, Mateo, C., Cava, F., Berenguer, J., Vega, D., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., 2009. Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization. J. Mol. Catal. B-Enzym. 58, 158-163.

Bolivar, J.M., **Rocha-Martín, J.**, Godoy, C., Rodrigues, R.C., Guisan, J.M., 2010. Complete reactivation of immobilized derivatives of a trimeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Process Biochem. 45, 107-113.

Sólo a partir de Darwin se ha comprendido que no somos la “especie elegida”, sino una especie única entre otras muchas especies únicas, aunque eso sí, maravillosamente inteligente.

Y no deja de ser paradójico que tantos siglos de ciencia nos hayan llevado a saber algo que cualquier bosquimano del Kalahari, cualquier aborigen australiano, o cualquiera de nuestros antepasados que pintaron los bisontes de Altamira conocía de sobra: que la Tierra no pertenece al hombre, sino que el hombre pertenece a la Tierra.

*Juan Luis Arsuaga/ Ignacio Martínez, **La especie elegida**.*

